

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Mai-Brit Tänava

**Replikatiivse helikaasi subühiku MCM3 ja transkriptsioonifaktori NRF2 käitumise võrdlus
oksüdatiivse stressi tingimustes**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendajad

Vanemteadur Ivar Ilves, PhD

Nooremteadur Siret Somarokov, MSc

TARTU 2016

Replikatiivse helikaasi subühiku MCM3 ja transkriptsioonifaktori NRF2 käitumise võrdlus oksüdatiivse stressi tingimustes

Korrektne DNA replikatsioon on raku jagunemise võtmeprotsess ning peab olema rangelt reguleeritud ka oksüdatiivse stressi tingimustes. Baseerudes teadmisele, et replikatiivse helikaasi kompleksi MCM2–7 subühik MCM3 interakteerub oksüdatiivse stressi vastase signaalraja KEAP1-NRF2 sensorvalgu KEAP1-ga, võrreldi MCM3 ja NRF2 vastust oksüdatiivsele stressile. Käesoleva töö tulemused vihjavad potentsiaalse KEAP1-MCM3 signaalraja olemasolule. Kasutades kolme erinevat oksüdatiivse stressi indutseerijat – H_2O_2 , tBHQ, $KBrO_3$ – selgus, et antud signaalrada aktiveerub H_2O_2 spetsiifiliselt. MCM3 regulatsioon KEAP1 kaudu toimub tõenäoliselt mitte-klassikalise mehhanismi järgi, mille kohaselt kogutakse MCM3 valk KEAP1 sõltuvalt tsütoskeletile, kuid ei reguleerita selle proteolüüsi. Erinevate stressorite kasutamine viitas asjaolule, et tBHQ ja $KBrO_3$ aktiveerivad KEAP1-te klassikalisel ning H_2O_2 mitte-klassikalisel moel.

Märksõnad: DNA replikatsiooni regulatsioon, MCM3, NRF2, KEAP1, oksüdatiivne stress
CERCS kood : B200 Tsütoloogia, onkoloogia ja kantseroloogia

Comparison of the behavior of replicative helicase subunit MCM3 and transcription factor NRF2 under oxidative stress conditions

The correct execution of DNA replication is a key process in cell division and therefore it must be strictly regulated in conditions of oxidative stress. A well-known response pathway against oxidative stress is the KEAP1-NRF2 signaling pathway. Based on the knowledge that the replication helicase complex MCM2–7 subunit MCM3 also interacts with KEAP1, the regulation of MCM3 and NRF2 in oxidative stress was compared. The results of this study suggest a potential KEAP1-MCM3 signaling pathway. It was revealed by using three different oxidative stress inducers (H_2O_2 , tBHQ, $KBrO_3$) that the MCM3 targeting pathways is activated specifically by H_2O_2 . MCM3 regulation through KEAP1 is likely to be directed through a nonclassical mechanism, where MCM3 is bound to cytoskeleton but is not ubiquitinated and proteolytically degraded. Therefore KEAP1 does not seem to regulate the proteolysis of MCM3. In addition, it was shown that tBHQ and $KBrO_3$ are canonical KEAP1 activators and H_2O_2 is a noncanonical one.

Keywords: DNA replication regulation, MCM3, NRF2, KEAP1, oxidative stress
CERCS code: B200 Cytology, oncology and cancerology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	9
1.1. DNA replikatsioon	9
1.1.1. MCM2–7 helikaasi kompleks.....	9
1.1.2. DNA replikatsiooni <i>origin</i> ´id	10
1.1.3. Replikatsiooni litsentseerimine	11
1.1.4. Helikaasi aktivatsioon	11
1.2. DNA replikatsiooni regulatsioon	13
1.2.1. MCM valkude lokalisatsioon	13
1.3. Oksüdatiivne stress rakkudes	14
1.3.1. Oksüdatiivse stressi vastane kaitse, KEAP1-NRF2 rada.....	15
1.3.2. KEAP1 struktuur	16
1.3.3. NRF2 struktuur	17
1.4. Ubikvitineerimine kui valgutaseme regulatsioonimehhanism.....	19
1.4.1. Proteasoom	20
1.5. Replikatiivse helikaasi MCM2–7 subühikud MCM3 ja MCM7 KEAP1 interaktsioonipartneritena	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1. Töö eesmärgid.....	22

2.2.	Materjalid ja metoodika	22
2.2.1.	Töös kasutatud rakuliin ning selle kasvatamine koekultuuris	22
2.2.2.	Oksüdatiivse stressi ja proteasoomi inhibitsiooni esilekutsumine rakkudes	22
2.2.3.	Rakkude fraktsioneerimine	23
2.2.4.	<i>Western blot</i> analüüs.....	24
2.3.	Tulemused.....	27
2.3.1.	MCM3 ja NRF2 valkude taseme ja lokalisatsiooni muutus H ₂ O ₂ ning proteasoomi inhibiitorite toimetel.....	27
2.3.2.	Teiste oksüdatiivsete stressorite mõju MCM3 ja NRF2 valkude tasemele ning lokalisatsioonile võrreldes H ₂ O ₂ -ga	32
2.3.3.	MCM3 ja NRF2 valgu ubiquitineerimine erinevates rakufraktsioonides oksüdatiivse stressi toimetel.....	34
2.4.	Arutelu	36
	KOKKUVÕTE	40
	SUMMARY	41
	KIRJANDUSE LOETELU.....	42
	TÄNUSÕNAD	51
	LIHTLITSENTS.....	52

KASUTATUD LÜHENDID

ARE – antioksidandi vastuse element (ingl *antioxidant response element*)

BTB – KEAP1 domeen (ingl *Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a` brac*)

Cdc6 – raku jagunemist kontrolliv valk 6 (ingl *cell division cycle 6*)

Cdc45 – raku jagunemist kontrolliv valk 45 (ingl *cell division cycle 45*)

CDK – tsükliin sõltuv kinaas (ingl *cyclin-dependent protein kinase*)

Cdt1 – raku jagunemist kontrolliv valk 1 (ingl *chromatin licensing and DNA replication factor 1*)

ChBNE – kromatiiniga seotud tuuma ekstrakt (ingl *chromatin bound nuclear extract*)

CMG – Cdc-45, MCM2–7 ja GINS valgukompleks

CPE – tsütoplasmaatiline ekstrakt (ingl *cytoplasmic extract*)

CUL3 – kulliin 3 (ingl *cullin 3*)

CySk – tsütoskeleti fraktsioon (ingl *cytoskeleton*)

DDK – Dbf4-Cdc7 kinaas (ingl *Dbf4-dependent kinase*)

DGR – KEAP1 topelt glütsiin kordus domeen (ingl *double glycine repeat*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid (ingl *dimethyl sulfoxide*)

Dpb11 – DNA replikatsiooni regulaator [ingl *DNA replication regulator DNA Polymerase B (II)*]

dsDNA – kaheaheelaline DNA (ingl *double stranded DNA*)

GINS – *Go, Ichi, Ni, San*, jaapani keeles 5, 1, 2, 3, tähistab subühikuid Sld5-Psf1-Psf2-Psf3

E1 – ubikvitiini aktiveeriv enüüm

E2 – ubikvitiini konjugeeriv enüüm

E3 – ubikvitiin-proteiin ligaas

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat (ingl *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EpRE – elektrofiili vastuse element (ingl *electrophile response element*)

IVR – vahepealne regioon (ingl *intervening region*)

KBrO₃ – kaaliumbromaat (ingl *potassium bromate*)

KEAP1 – Kelch sarnane ECH seotud valk 1 (ingl *Kelch-like ECH associated protein 1*)

MAF – transkriptsioonifaktor (ingl *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*)

MCM – minikromosoomi säilitamine (ingl *minichromosomal maintenance*)

ME – membraani ekstrakt (ingl *membrane extract*)

Neh – NRF2 domeenid (ingl *NRF2–ECH homology*)

NES – tuuma ekspordi signaal (ingl *nuclear export signal*)

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (ingl *nuclear localization signal*)

NRF2 – NF-E2 seotud faktor 2 [ingl *nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2*]

ORC – replikatsiooni alguspunkti ära tundev kompleks (ingl *origin recognition complex*)

P – lahustumatu fraktsioon (ingl *pellet*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl *phosphate-buffered saline*)

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (ingl *phenylmethanesulfonylfluoride*)

pre-RC – pre-replikatsiooni kompleks (ingl *pre-replication complex*)

PVDF – polüvinülideenfluoriid

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxigen species*)

S – lahustuv fraktsioon (ingl *soluble*)

SDS – naatrium dodetsüülsulfaat (ingl *sodium dodecyl sulfat*)

Sld – DNA replikatsiooni regulaatorvalk (ingl *DNA replication regulator synthetically lethal with Dpb11-1*)

SNE – lahustuv tuuma ekstrakt (ingl *souluble nuclear extract*)

ssDNA – üheaheelaline DNA (ingl *single stranded DNA*)

tBHQ – *tert*-butüülhüdrokinoon (ingl *tert-butylhydroquinone*)

SISSEJUHATUS

DNA replikatsioon mängib keskset rolli raku jagunemises ja geneetilise informatsiooni edasi kandmises. Oma vastutusrikka töö tegemiseks peab replikatsioon olema rangelt reguleeritud ning väga täpne protsess. Replikatsiooni initsiatsiooni ning elongatsiooni üheks võtmekomponendiks on replikatiivse helikaasi MCM2–7 heteroheksameerne kompleks. Replikatsiooni initsiatsioon on jaotatud kaheks oluliseks etapiks, mis on eraldatud kahe rakutsükli faasi vahel. Esimeses etapis märgitakse ära DNA replikatsiooni alguspunktid, mille käigus laetakse dimeriseerunud MCM2–7 helikaasi kompleksid tulevastele *origin*'idele. Teises etapis aktiveeritakse pealelaetud MCM2–7 helikaasid, mille tulemusel moodustub replikatsiooni käivitamiseks vajalik CMG kompleks.

Rakud peavad ennast pidevalt kaitsma erinevate endogeensete ja eksogeensete stressorite eest, mis ohustavad raku elujõulisust. Üheks oluliseks mõjuriks on reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxygen species*, ROS), mis võivad kahjustada raku eri komponente, sealjuures ka DNA-d. Raku üks peamisi kaitsemehhanisme oksüdatiivse, elektrofiilse ja ksenobiootilise stressi vastu on transkriptsioonifaktori NRF2 ja sensorvalgu KEAP1-e interaktsioonil põhinev signaalrada. Normaaltingimustes hoiab KEAP1 oma keskse interaktsioonipartneri – NRF2 – taseme madalal, indutseerides selle ubiquitineerimist ja edasist proteolüüsi. Stressi tingimustes NRF2 aga vabaneb, translokeerub tuuma ning aktiveerib mitmete, oksüdatiivse stressi vastu kaitsvate, geenide ekspressiooni.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on võrrelda MCM2–7 subühiku MCM3-e ning transkriptsioonifaktori NRF2-e käitumist vastusena oksüdatiivsele stressile. Võrdluse lähtepunktiks on asjaolu, et NRF2-e kõrval interakteerub ka MCM3 sensorvalgu KEAP1-ga. Sarnasused MCM3 ja NRF2 valkude käitumises viitaksid analoogsele regulatsioonimehhanismile, kus võiks oma osa mängida ka KEAP1. Oksüdatiivse stressi indutseerija kõrval võeti kasutusele ka elektrofiilse ja ksenobiootilise stressi aktivaatorid, nägemaks võimalikke sarnasusi või erinevusi stressitüübist sõltuvalt.

Käesolev bakalaureusetöö valmis Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Ivar Ilvese ja Siret Somarokovi juhendamisel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. DNA replikatsioon

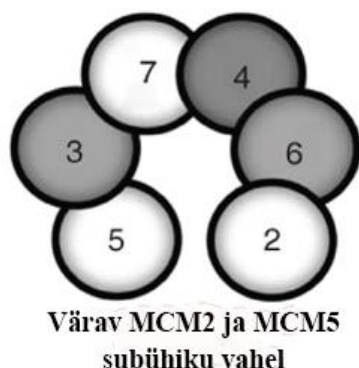
DNA replikatsioon on protsess, mille käigus duplitseeritakse kogu raku geneetiline materjal ning tekkinud kaks DNA koopiat jaotatakse järgneva raku jagunemise käigus kahe tütaraku vahel võrdselt ära. DNA replikatsioonil on keskne roll iga elusorganismi kasvus ja arengus. Kui DNA replikatsioon on vigane, võib see viia suurte muutusteni geneetilises informatsioonis, näiteks geeni koopiarvu muutused, DNA kahjustused ja geneetiline ebastabiilsus (Green & Li, 2005), mis võivad omakorda soodustada vähkkasvajate teket (Blow & Gillespie, 2008). Replikatsiooni esimene etapp – replikatsiooni initsiatsioon on kriitilise tähtsusega ning peab olema väga täpselt reguleeritud. Replikatsiooni initsiatsioon sõltub väga paljudest valgulistest komponentidest ja trans-aktivaatoritest (Costa et al., 2013). Mitmed replikatsiooni initsiatsiooni regulaatorid on kõigis elu domeenides konserveerunud ning see rõhutab nende regulaatorite funktsiooni olulisust (Iyer et al., 2004; Liu et al., 2000).

1.1.1. MCM2–7 helikaasi kompleks

Replikatiivse helikaasi aktiivsus on hädavajalik DNA replikatsiooni läbiviimiseks, andes DNA polümeraasile üheaheelalise DNA (ingl *singel stranded DNA*, *ssDNA*) matriitsi, millele sünteesida uus komplementaarne ahel (Matson et al., 1994). Tänu oma kriitilisele tähtsusele on helikaasi kompleks põhiline DNA replikatsiooni regulatsiooni sihtmärk.

Eukarüoosis on helikaasi mootoriks heksameerse struktuuriga rõngakujuline MCM2–7 (ingl *minichromosome maintenance* valgud 2–7) kompleks (Forsburg, 2004), mis koosneb kuuest, kindlas järjekorras olevast, subühikust MCM 5→3→7→4→6→2(→5), mis võivad spontaanselt moodustada avatud heksameerse rõnga ka siis, kui substraati pole (Crevel, 2001; Davey et al., 2003; Costa et al., 2011; Lyubimov et al., 2012) (Joonis 1). Rõnga keskele jääb avaus mahutamaks kaheaheelalist DNA-d (ingl *double stranded DNA*, *dsDNA*) (Remus et al., 2009; Costa et al., 2011). MCM2–7 kompleksi MCM2 ja MCM5 subühikute vaheline interaktsioon on nõrgim (Crevel, 2001; Davey et al., 2003) ning nende vahel paikneb heksameeri värav (Joonis 1). MCM2-MCM5 värav on oluline heksameeri DNA-le laadimiseks (Costa et al., 2011), kui seda kunstlikult blokeerida, siis on MCM-ide edasine laadimine takistatud (Samel et al., 2014). Rakutsükli DNA sünteesi faasis helikaas aktiveeritakse ning tänu lisafaktoritele tekib aktiivne

kompleks (Joonis 2). Aktiveeritud kompleks on võimeline ATP hüdroolüüsi jõul DNA dupleksis olevate aluspaaride vahelisi vesiniksidemeid lõhkuma ja dsDNA ahelaid 3'-5' suunaliselt lahti harutama (Ishimi, 1997; Bochman & Schwacha, 2008). Tekkiv kompleks peab jääma väga stabiilseks ning püsima ühes tükis kuni replikatsiooni lõpuni, sest iga individuaalne helikaasi kompleks laetakse DNA-le vaid ühe korra rakutsükli jooksul (Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009; Kuipers et al., 2011).



Joonis 1. MCM2–7 subühikute paiknemine avatud heksameerses rõngas. MCM2–7 subühikud on märgistatud numbritega 2–7. MCM5 ja MCM2 subühiku vahel paikneb värv. Modifitseeritud joonis Costa et al (2011) põhjal.

1.1.2. DNA replikatsiooni *origin*’id

Replikatsiooni *origin* on spetsiifiline koht DNA-l, kuhu kinnituvad DNA sünteesi läbiviivad valgud ning kus algab DNA ahelate lahti harutamine ja uute ahelate süntees. Bakterite rõngaskromosoomis leidub vaid üks kindla nukleotiidses järjestuses replikatsiooni alguspunkt, kust saab alguse bidirektsionaalne replikatsioon (Gille & Messer, 1991). Eukarüootidel on tänu oma genoomi keerukusele ja suurusele mitmeid *origin*’e igas kromosoomis (Méchali, 2010). Eukarüootse raku DNA replikatsiooni initsiatsiooni kontroll peab olema väga tõhus, mis tagab selle, et kogu genoom saab replitseeritud ning ükski *origin* ei alusta replikatsiooni rohkem, kui ühe korra rakutsükli käigus. Selle saavutamiseks on replikatsiooni initsiatsioon ning selle regulatsioon jagatud kaheks oluliseks etapiks, mis on eraldatud kahe rakutsükli faasi vahel (Méndez & Stillman, 2000; Bell & Dutta, 2002; Blow & Dutta, 2005). Replikatsiooni initsiatsiooni esimene etapp on *origin*’i litsentseerimine, mille käigus laetakse dimeriseerunud MCM2–7 helikaasi kompleksid tulevastele *origin*’idele (Remus et al., 2009; Evrin et al., 2009) (Joonis 2). Teine etapp on *origin*’i aktiveerimine, mil eelnevalt dsDNA-le laetud helikaasi kompleksid aktiveeritakse, mille järgselt on nad valmis DNA kaksikahelat lahti harutama (Remus

et al., 2009; Evrin et al., 2009; Gambus et al., 2011) (Joons 2). *Origin*'i litsentseerimine leiab aset hilisest M faasist G1 faasini, *origin*'i aktiveerimine aga G1/S faasi üleminekul (Méndez & Stillman, 2000).

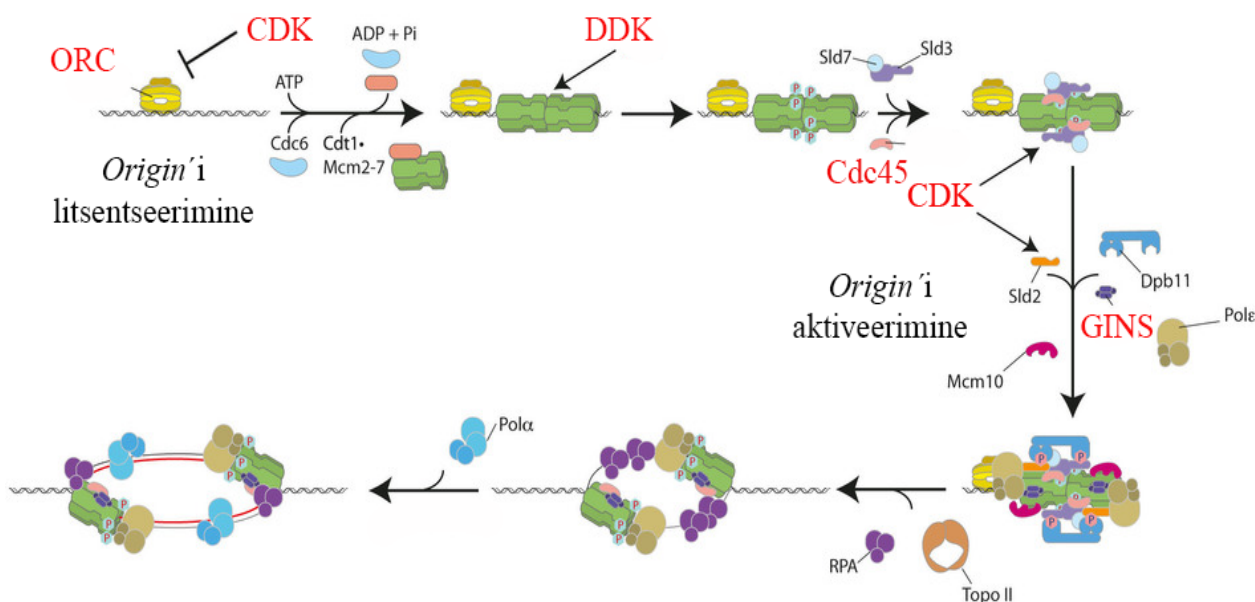
1.1.3. Replikatsiooni litsentseerimine

Replikatsiooni litsentseerimine tähistab kahe MCM2–7 heksameeri kompleksi laadimist *origin*'i ära tundva kompleksi ORC (ingl *origin recognition complex*) poolt märgistatud alguspunktile kahe valgu – Cdc6 (ingl *cell division cycle 6*) ja Cdt1 (ingl *chromatin licensing and DNA replication factor 1*) vahendusel (Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009; Bell & Stillman, 1992) (Joonis 2). Selle tulemusel moodustub topeltheksameerne pre-replikatsiooni kompleks (pre-RC), mille koosseisu kuuluv MCM2–7 heksameerne rõngas ümbritseb dsDNA-d (Diffley et al., 1994; Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009). ORC on replikatsiooni initsiaatorikompleks eukarüootides, see koosneb kuuest subühikust, mis seonduvad omakorda seitsmenda faktori – Cdc6-ga (Liang et al., 1995; Cocker et al., 1996; Speck et al., 2005; Chen et al., 2007). ORC koos Cdc6-ga tunneb ja märgib ära DNA replikatsiooni alguspunktid ning üle faktori Cdt1 laetakse helikaasi kompleksi MCM2–7 heksameerid DNA-le (Nishitani et al., 2000; Speck et al., 2005; Chen et al., 2007). Laadimise ajal toimuvad MCM2–7 kompleksis mitmed konformatsioonilised muutused, mis on vajalikud ühtse dsDNA-ga seotud topeltheksameeri tekkeks. Esmalt on vajalik nii heksameersete rõngaste avamine dsDNA sisse haaramiseks kui ka nende sulgemine dsDNA lukustamiseks läbi MCM2-5 värava (Costa et al., 2011; Samel et al., 2014). DNA-le laetud MCM2–7 heksameerid interakteeruvad omavahel kummagi helikaasi kompleksi subühiku N-terminaalse domeeni kaudu (Remus et al., 2009; Evrin et al., 2009). MCM2–7 laadimiseks DNA-le on MCM subühikute ATP hüdroolüüs absoluutselt vajalik põhjustades konformatsioonilisi muutusi (Remus et al., 2009; Coster et al., 2014; Kang et al., 2014). Topeltheksameerne MCM2–7 kompleks üksi on inaktiivne ning omab madalat aktiivsust DNA dupleksi lahti harutamises (Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009; Gambus et al., 2011).

1.1.4. Helikaasi aktivatsioon

Replikatsiooni alguspunkti litsentseerimise käigus dsDNA-le laetud topeltheksameerne MCM2–7 kompleks jääb inaktiivseks seniks, kuni rakud sisenevad rakutsükli S-faasi ning käivitavad bidirektsionaalse replikatsiooni (Remus et al., 2009; Evrin et al., 2009; Gambus et al., 2011). Aktiivne helikaas omab kõrget ATPaasset aktiivsust ning on tänu sellele efektiivne DNA

kaksikahela lahti harutamises (Ilves et al., 2010). Helikaasi aktiveerimisel mängivad kandvat rolli viis valku – Cdc45 (ing *cell division cycle 45*) ja heterotetrameerne GINS (*Go, Ichi, Ni, San*, jaapani keeles 5, 1, 2, 3, tähistab subühikuid Sld5-Psf1-Psf2-Psf3), mille liitumisel MCM2–7 heksameerile tekib aktiivne helikaasi kompleks CMG (Cdc45-MCM2–7-GINS) (Moyer et al., 2006; Ilves et al., 2010; Kang et al., 2012) (Joonis 2). Cdc45 ja GINS annavad MCM2–7 rõngale vajaliku konformatsioonilise jäikuse, suurendavad kompleksi afiinsust DNA suhtes, talitlevad MCM2-5 värava "uksena", interakteeruvad teiste replikatsioonivalkudega ning koordineerivad niimoodi replikatiivset helikaasi kogu replisoomiga (Ilves et al., 2010). Lisaks orienteerivad Cdc45 ja GINS kõrvaletõrjutud ahela ja juhtahela replisoomi suhtes korrektselt (Petojevic et al., 2015).



Joonis 2. Origin'i litsentseerimine ja aktiveerimine mudelorganismis *S. cerevisiae*. Origin'i litsentseerimise käigus laetakse MCM2–7 heksameerid ORC poolt märgistatud alguspunktile Cdc6 ja Cdt1 vahendusel. Origin'i aktiveerimise käigus seonduvad inaktiivsele MCM2–7 kompleksile Cdc45 ja GINS ning moodustub aktiivne CMG (Cdc45-MCM2–7-GINS) kompleks. Regulatsiooni eest vastutavad kinaasid CDK ja DDK. Aktivatsiooniks vajalikud lisafaktorid on Sld2, Sld3, Sld7 (ingl *DNA replication regulator synthetically lethal with Dpb11-I*), Dpb11 [ingl *DNA polymerase B (II)*], DNA polümeraas ϵ ja α , MCM10, RPA ja Topo II (Yeeles et al., 2015). Modifitseeritud joonis Yeeles et al. (2015) põhjal.

Kaheahelalise DNA sulamine *origin'il* kaasneb kõige tõenäolisemalt Cdc45 ja GINS-i laadimisega MCM2–7-le, mille käigus MCM rõngas "pinguldub" ja selle keskne kanal jääb dsDNA jaoks liiga kitsaks (Ilves et al., 2010). Kuidas ahelate esimeseks lahti sulatamiseks vajalikud molekulaarsed liikumised sealjuures saavutatakse pole veel lõpuni selge. Inaktiivses vormis ümbritseb kaksikheksameerne MCM2–7 dsDNA-d, kuid aktivatsiooni järgselt

translokeeruvad aktiivsed CMG-d ssDNA ümber (Costa et al., 2011) (Joonis 2). Kummastki CMG-ga ümbritsetud ssDNA-st saab juhtiv ahel, millele hakatakse sünteesima komplemetaarset mahajäävat ahelat (Kang et al., 2012).

1.2. DNA replikatsiooni regulatsioon

Replikatsiooni initsiatsiooni regulatsiooni kaks kõige tähtsamat ülesannet on esmajoones kindlustada, et süntees toimuks õiges kohas ja õigel ajahetkel ning seejärel tagada DNA ahelate lahti hargnemine ja korrektse replisoomi moodustumine (Diffley, 2004). Ülimalt oluline on vältida DNA mitmekordset replikatsiooni, mis võib põhjustada genoomi ulatuslike kahjustusi (Green & Li, 2005). Peamine regulatsioon toimub rakutsüklist lähtuvalt, mida vahendatakse tsükliin sõltuvate (CDK, ingl *cyclin-dependent protein kinase*) ja Dbf4-sõltuvate proteiinkinaasdega (DDK, ingl *Dbf4-dependent kinase*), mille aktiivsus kõigub vastavalt rakutsüklile (Siddiqui et al., 2013; Tanaka & Araki, 2013).

Hilises M ja G1 faasis on CDK-d inaktiivsed lubades pre-RC-de moodustumist (Piatti et al., 1996; Méndez & Stillman, 2000). S faasi jõudes CDK-de aktiivsus tõuseb, mis blokeerib uute pre-replikatiivsete komplekside moodustumise, kuid lubab helikaasi kompleksi aktiveerimise eest vastutavate faktorite liitumist, toetades replikatsiooni initsiatsiooni (Yabuuchi et al., 2006) (Joonis 2). Pagaripärimis *Saccharomyces cerevisiae*'s välditakse pre-RC-de moodustumist S faasis ORC kompleksi inaktiveerimise, Cdc6 valgu lagundamise ning MCM subühikute tuumast välja ekspordi kaudu (Nguyen et al., 2001). Kõrgemates eukarüootides blokeerib litsentseerimist väljaspool G1 faasi lisaks CDK-le ka geminin valk, mis inhibeerib helikaasi laadijat Cdt1-te (Wohlschlegel et al., 2000; Arias & Walter, 2005).

1.2.1. MCM valkude lokalisatsioon

Pärmis reguleeritakse DNA replikatsiooni ka MCM2–7 kompleksi rakutsüklist sõltuva lokalisatsiooni kaudu. G1 faasis on MCM2–7 kompleksid koondunud tuuma, S faasis toimub nende järkjärguline eksport tsütoplasmasse (Nguyen et al., 2000a). G2 ja M faasiks on kõik MCM2–7 kompleksid, CDK sõltuvalt, rakutuumast välja transporditud, et vältida pre-RC-de taasteket (Nguyen et al., 2000b). Teiste eukarüootide puhul pole rakutsüklist sõltuvat MCM2–7 lokalisatsiooni regulatsiooni tuvastatud. Inimese rakkudes lokaliseeruvad MCM2–7 kompleksid tuumas terve rakutsükli vältel (Schulte et al., 1995), muutmata oma taset (Méndez & Stillman,

2000). Rakutsüklist sõltuvalt muutub aga MCM2–7 komplekside laadimine kromatiinile. Mitoosi järgselt laetakse replikatiivsed helikaasid kromatiinile ning eemaldatakse pärast sünteesi faasi (Méndez & Stillman, 2000).

MCM2–MCM7 valgud esinevad rakus enamasti heksameeri kujul, mis on vajalik eeldus helikaasi kompleksi transpordiks rakutuuma (Kimura et al., 1996). Kompleksi kokkupanek toimub tsütoplasmas ning selle import rakutuuma tagatakse spetsiifiliste tuuma lokalisatsiooni signaalidega (ingl *nuclear localization signal*, NLS). Vastavad signaalid on tuvastatud MCM2 (Nguyen et al., 2000a) ja MCM3 (Young et al., 1997) subühikutel, mis eeldatavasti vahendavad kompleksi ülekannet rakutuuma (Liku et al., 2005). Pärmis on vajalik ka helikaasi kompleksi tuuma ekspordi signaal (ingl *nuclear export signal*, NES), mis tagab S faasis MCM2–7 kompleksi transpordi tuumast välja (Nguyen et al., 2000a), vastav signaal on leitud MCM3 subühikul (Liku et al., 2005). Inimese rakkudes tundub mängivat MCM3 subühik kõige suuremat rolli MCM2–7 transpordis ja kromatiinile laadimises, omades nii NLS kui NES järjestusi.

1.3. Oksüdatiivne stress rakkudes

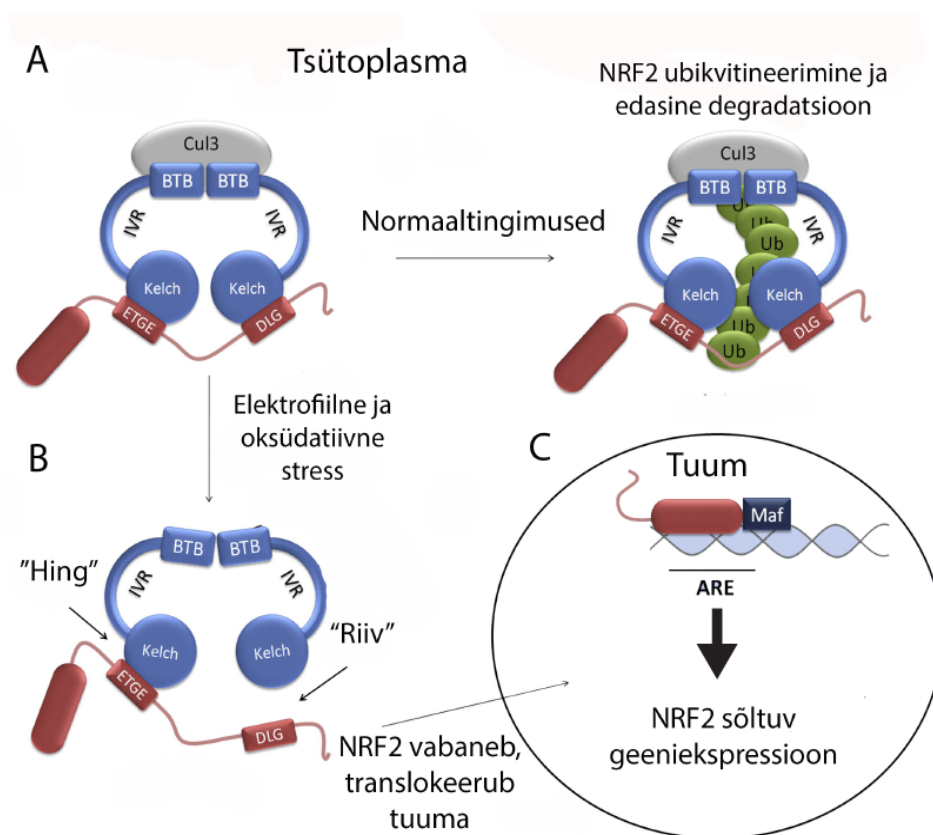
Rakud peavad ennast pidevalt kaitsma erinevate kahjustavate tegurite eest ning üheks kõige enamlevinud kahjustajaks on reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxygen species*, ROS). Need ühendid omavad kõrget reaktsioonivõimet ning põhjustavad erinevate biomolekulide, sealhulgas ka nukleiinhapete, struktuuri või funktsiooni muutusi, mis toovad endaga kaasa raku eri komponentide kahjustusi (Cadet, 2003; Ma, 2010). Enamlevinud ROS-id on superoksiidi anioon ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hüdroksüülradikaal (OH^{\bullet}) ja vesinikperoksiid (H_2O_2) (Hensley et al., 2000). Madalas kontsentratsioonis on reaktiivsed hapnikuühendid rakus normaalne nähtus, tekkides erinevate metaboolsete radade käigus (Siraki et al., 2002; Inoue et al., 2003), aga ka mitmesuguste väliste tegurite nagu kemikaalide, ksenobiootiliste ainete, ravimite, raskemetallide, UV- ja röntgenkiirguse toimel (De Bont & van Larebeke, 2004; Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009). Kui ROS-ide kontsentratsioon rakus suureneb ning antioksidatiivsed kaitsemehhanismid pole piisavad nende neutraliseerimiseks, tekib oksüdatiivne stress. Kahjustuste mõju rakule on korrelatsioonis oksüdatiivse stressi ulatusega. Lühiajalise ja mõõduka oksüdatiivse stressiga saavad rakud edukalt hakkama, see võib isegi rakkude kasvu stimuleerida (Forman et al., 2002; Forman et al., 2004). Madalas kontsentratsioonis võivad ROS-id olla signaalmolekulideks ning aktiveerida erinevaid kaitsemehhanisme (Forman et al., 2002; Forman et al., 2004). Pikaajalise

ning sügava stressi korral on aga kahjustused märksa tõsisemad lõppedes isegi raku apoptoosi või nekroosiga (Valko et al., 2007; Ma, 2010). Reaktiivsete hapnikuühendite poolt põhjustatud DNA kahjustused on näiteks aluste oksüdatsioon või ühe- ja kaheahelalised katkeid (Cadet, 2003). Kahjustused rakutasandil on eelduseks suuremate vigastuste tekkele. Oksüdatiivne stress mängib olulist rolli organismi üldises vananemises ning mitmete haiguste tekkes, nende hulgas südame- ja veresoonekonna haigused, neuroloogilised häired, diabeet ja kasvaja (Valko et al., 2007).

1.3.1. Oksüdatiivse stressi vastane kaitse, KEAP1-NRF2 rada

Oksüdatiivse stressi eest on rakul kaitseks mitmeid erinevad mehhanisme, üheks olulisemaks on tsüsteiinirikka sensorvalgu KEAP1 (ingl *Kelch-like ECH associated protein 1*) ning transkriptsioonifaktori NRF2 (ingl *NF-E2 p45-related factor 2*) interaktsioonil tuginev signaalrada (Itoh et al., 1999) (Joonis 3). KEAP1-NRF2 rada aktiveerivad mitmesugused ekso- ja endogeensed mõjurid, mis otseselt muudavad raku redoks-seisundit. Normaalolekus säilitatakse raku redoks homöostaas ning oksüdatiivse stressi eest kaitsvate geenide ekspressiooni eest vastutava transkriptsiooni regulaatori – NRF2 – tase hoitakse madalana (Itoh et al., 1999). NRF2 rakusisese taseme ja lokalisatsiooni eest vastutab ROS-idele ning ksenobiootikumidele reageeriv sensorvalk KEAP1 (Itoh et al., 1999). Tavatingimustes on KEAP1 NRF2-ga seotud ning KEAP1 koosseisus olev CUL3-E3 ubikvitiinligaas kompleks suunab NRF2 proteasomaalsele lagundamisele (Kobayashi et al., 2004; Cullinan et al., 2004; Zhang et al., 2004) (Joonis 3A). Stressiseisundis toimuvad KEAP1-s spetsiifilised konformatsioonilised muutused, mille tõttu pole sellel enam võimalik NRF2-te siduda ning see võimaldab NRF2-l stabiliseeruda, akumuliseeruda ja lõpuks ka tuuma translokeeruda (Itoh et al., 1999; Dinkova-Kostova et al., 2002) (Joonis 3B). NRF2 C-terminuses on nii tuuma lokalisatsiooni- (NLS) kui ka tuuma ekspordisignaal (NES), mis vahendavad valgu liikumist tsütoplasma ja rakutuuma vahel, normaalolekus hoiab KEAP1 NRF2-te tsütoplasmas (Jain et al., 2005). Tuumas heterodimeriseerub vaba NRF2 väikeste MAF (ingl *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) perekonna transkriptsiooni kofaktoritega ning aktiveerib ARE (ingl *antioxidant response element*; tuntud ka kui EpRE, ingl *electrophile response element*) sõltuvate antioksüdantsete, detoksifitseerivate ja ksenobiootilise stressi eest kaitsvate geenide ekspressiooni, mille eesmärgiks on raku homöostaas taastada (Venugopal & Jaiswal, 1996; Itoh et al., 1997; Nguyen et al., 2000b; Ishii, 2000; Hirotsu et al., 2012) (Joonis 3C). Kui NRF2 geen kunstlikult välja lülitada, siis langeb tunduvalt organismi vastupanu oksüdatiivse ja

ksenobiootilise stressi suhtes (Chan & Kan, 1999; Ishii, 2000; Iida et al., 2004; Kitamura et al., 2007).

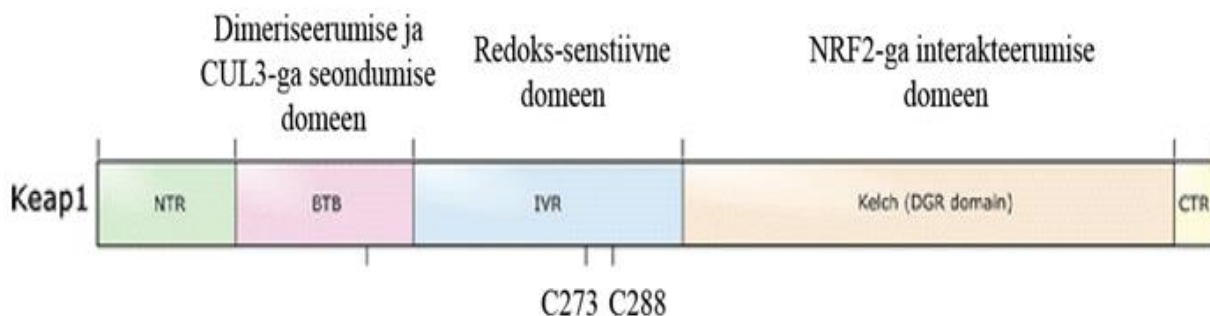


Joonis 3. KEAP1-NRF2 rada rakus. (A) Homodimeerne KEAP1 on kompleksis CUL3-E3 ligaaskompleksiga. Normaalingimustes NRF2 ubikvitineeritakse ja degradeeritakse 26S proteasomi poolt. (B) Elektrofiilse/oksüdatiivse/ksenobiootilise stressi korral modifitseeruvad KEAP1-e tsüsteiinjääke sisaldav IVR domeen, mille tulemusel pole NRF2 enam kõlblikus orientatsioonis ubikvitineerimise ja edasise degradatsiooni tarbeks. NRF2 vabaneb ja translokeerub tuuma. (C) Tuumas heterodimeriseerub NRF2 väikeste MAF valkudega ning käivitab ARE sõltuvate geenide ekspressiooni. Modifitseeritud joonis Kansanen et al. (2013) põhjal.

1.3.2. KEAP1 struktuur

KEAP1 sensormolekul sai oma nime *Drosophila* aktiini siduva valgu Kelch (Xue and Cooley 1993) järgi, sest KEAP1 omab sarnaselt Kelch valgule aktiini siduvat domeeni (Itoh et al., 1999). KEAP1 koosneb järgnevatest põhidomeenidest: Kelch/DGR (ingl *Kelch-like ECH associated protein 1; double glycine repeat*), BTB (ingl *Broad-Complex, Tramtrack, and Bric a` brac*) ja IVR (ingl *intervening region*) (Joonis 4). Kuuest Kelch motiivist koosnev Kelch domeen on vajalik nii interaktsiooniks NRF2-ga (Itoh et al. 1999; McMahon et al. 2004) kui ka seondumiseks raku tsütoskeleti valgu, aktiiniga (Kang et al., 2004; Itoh et al., 1999). KEAP1

ankurdumine aktiini külge on oluline NRF2 hoidmiseks raku tsütoplasmas (Kang et al., 2004). IVR domeen on redoks-sensoriks, sisaldades väga reaktiivseid tsüsteiinjääke, mis on tundlikud oksüdatiivsete molekulide suhtes (Dinkova-Kostova et al., 2002). Puutudes kokku oksüdeerivate ühenditega, toimub IVR domeenis olevate tsüsteiinjääkide modifikatsioon, peale mida pole Kelch domeen enam võimeline uute NRF2 molekulidega seonduma (Dinkova-Kostova et al., 2002; Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010). IVR domeenis on kõige olulisemad tsüsteiinijäägid C273 ja C288, nende muteerumisel NRF2 ubikvitineerimist ei toimu (Zhang & Hannink, 2003; Wakabayashi et al., 2004; Levonen et al., 2004; Kobayashi et al., 2006). BTB domeen on oluline nii KEAP1 dimeriseerumiseks kui ka NRF2 ubikvitineerimiseks, interakteerudes selle jaoks vajaliku CUL3 ubikvitiinligaasiga (Zipper and Mulcahy 2002; Lo et al. 2006). KEAP1 dimeriseerumine on vajalik, et ühte NRF2 molekuli siduda kahest kohast (Robinson and Cooley 1997; Zipper and Mulcahy 2002; Kang et al. 2004). Oksüdatiivsed stressorid indutseerivad KEAP1 ja CUL3 interaktsiooni dissotsiatsiooni ning läbi selle inhibeervad NRF2 ubikvitineerimist ja edasist proteasomaalset lagundamist (Cullinan et al., 2004; Zhang et al., 2004).

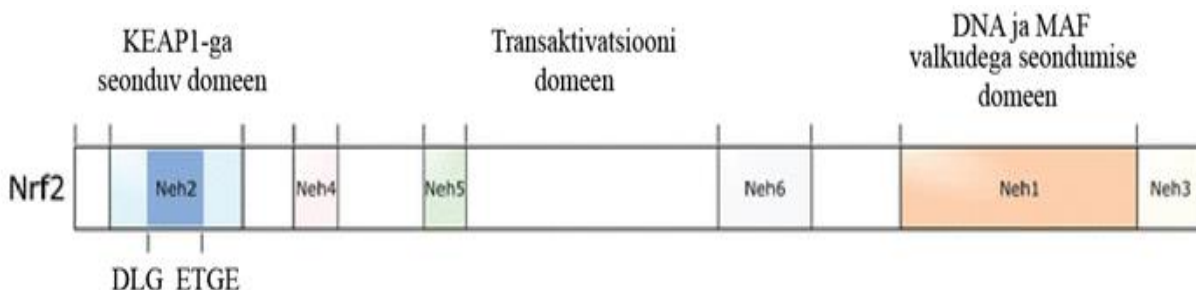


Joonis 4. KEAP1 struktuur. Oksüdatiivse stressi sensorivalk KEAP1 koosneb viiest domeenist: N-terminaalne regioon (NTR); KEAP1 homodimeriseerumise ning CUL3-ga interaktsiooni eest vastutav domeen (BTB); stressitundlik domeen (IVR), kus on olulised tsüsteiinijäägid C273 ja C288; NRF2 ja aktiiniga seonduv domeen (Kelch/DGR); C-terminaalne domeen (CTR). Modifitseeritud joonis Baird & Dinkova-Kostova (2011) põhjal.

1.3.3. NRF2 struktuur

NRF2 koosneb kuuest peamisest Neh domeenist (Neh1-6; ingl *NRF2–ECH homology*) (Itoh et al., 1999) (Joonis 5). Transkriptsiooni aktiveerimise eest vastutav Neh-1 domeen sisaldab heterodimeriseerumise ja DNA-ga seondumise regiooni (Moi et al., 1994). N-terminuses asuv Neh2 domeen sisaldab endas ETGE (Kobayashi et al. 2002) ja DLG (McMahon et al. 2004) motiivi, mis on vajalikud KEAP1dimeeriga interakteerumiseks (McMahon et al. 2006; Tong et al. 2006b). Lisaks sellele on Neh2 domeenis ka seitse lüsiinijääki, millele toimub KEAP1 sõltuva

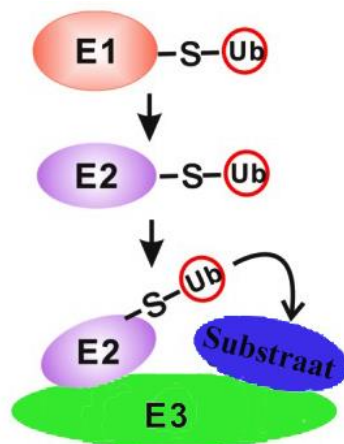
ubikvitineerimise käigus ubikvitiinketi lisamine (Zhang et al. 2004). Dimeriseerunud KEAP1 seondub monomeerse NRF2-ga tsükliliselt nn “hinge ja riivi” mudeli kaudu (McMahon et al. 2006; Tong et al., 2006a; Tong et al., 2006b). Esmalt tekib interaktsioon KEAP1 Kelch domeeni ja NRF2 ETGE motiivi ning seejärel ka DLG motiivi vahel. Esimene ühendus on justkui "hinge" ning teine "riiviks" (Joonis 3). Ühendus läbi mõlema motiivi annab NRF2-le kindla orientatsiooni, mis on vajalik ubikvitineerimiseks (Zhang et al., 2004; McMahon et al., 2006; Tong et al., 2007). Ühe motiivi puudumisel saab KEAP1 küll NRF2-te siduda, kuid see ei vii NRF2 degradatsioonini (McMahon et al., 2004; McMahon et al., 2006). Mõlema motiivi puudumisel ei toimu ka esmane seondumine (McMahon et al., 2006). ETGE ja DLG motiiv omavad KEAP1 suhtes erinevat seondumistugevust. ETGE afiinsus on suurem tänu KEAP1 ja selle motiivi vahel tekkivate elektrostaatiliste interaktsioonide rohkusele võrreldes DLG motiiviga (vastavalt 13 ja 8) (Tong et al., 2006b; McMahon et al., 2006; Padmanabhan et al., 2008). Oksüdatiivse stressi korral toimub KEAP1 konformatsiooniline muutus (Dinkova-Kostova et al., 2002), mille tagajärjel katkeb DLG interaktsioon NRF2 ja KEAP1 vahel (McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a; Tong et al., 2006b). Enam pole NRF2 sobivas orientatsioonis ubikvitineerimiseks ja NRF2 degradatsioon lakkab (Kobayashi et al., 2006; McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a; Tong et al., 2006b). Eelnevalt valmis sünteesitud NRF2-d jäävad KEAP1 külge läbi ETGE motiivi (McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a) (Joonis 3B) ja sellised kompleksid akumulereuvad raku tsütoplasmas (Kobayashi et al., 2006). Vastsünteesitud NRF2-d enam KEAP1 külge ei seonu ja saavad kohe tuuma translokeeruda ning detoksifitseerivate geenide ekspressiooni indutseerida (Kobayashi et al., 2006; McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a; Tong et al., 2006b).



Joonis 5. NRF2 struktuur. Transkriptsioonifaktor NRF2 koosneb kuuest domeenist: ETGE ja DLG motiivi sisaldav KEAP1-ga seonduv domeen (Neh2); transaktivatsiooni eest vastutavad domeenid (Neh3, Neh4, Neh5); NRF2 KEAP1 sõltumatu degradatsiooni domeen (Neh6), mis kontrollib NRF2 taset stressi olukorras (McMahon et al., 2004); MAF valkudega heterodimeriseerumise ja DNA-ga seondumise domeen (Neh1). Modifitseeritud joonis Baird & Dinkova-Kostova (2011) põhjal.

1.4. Ubikvitineerimine kui valgutaseme regulatsioonimehhanism

Rakus on mitmeid erinevaid mehhanisme valgutaseme reguleerimiseks. Üks nendest on ubikvitineerimine, mis kujutab endast ensümaatilist protsessi, mille käigus lisatakse substraat valgule väikeseid ubikvitiini molekule kas ükshaaval või pikema ketina (Hershko & Ciechanover, 1998). Substraat valgu ubikvitineerimine võib omada erinevaid tagajärgi, sõltudes lisatud ubikvitiin molekulide arvust ja sideme tüübist. Üheks olulisimaks tulemiks on valkude proteasomaalne degradatsioon 26S proteasoomis (Hershko & Ciechanover, 1998). Ubikvitiin-vahendatud degradatsioonil on tähtis roll kontrollimaks suurel hulgal erinevate rakuliste protsesside regulatsiooni, sealhulgas rakutsükli progressiooni, signaali ülekannet, transkriptsiooni ja endotsütoosi (Hershko & Ciechanover, 1998). Ubikvitineerimise protsessi viivad läbi 3 ensüümi, nendeks on ubikvitiini aktiveeriv ensüüm E1, ubikvitiini konjugeeriv ensüüm E2 ning ubikvitiin-proteiin ligaas E3 (Hershko et al., 1983). Esmalt aktiveeritakse ubikvitiini molekul E1 ensüümi poolt, seejärel antakse see üle E2 konjugeerivale ensüümile ning viimases etapis kantakse aktiveeritud ubikvitiin E3 ligaasi poolt substraadile (Hershko et al., 1983) (Joonis 6).



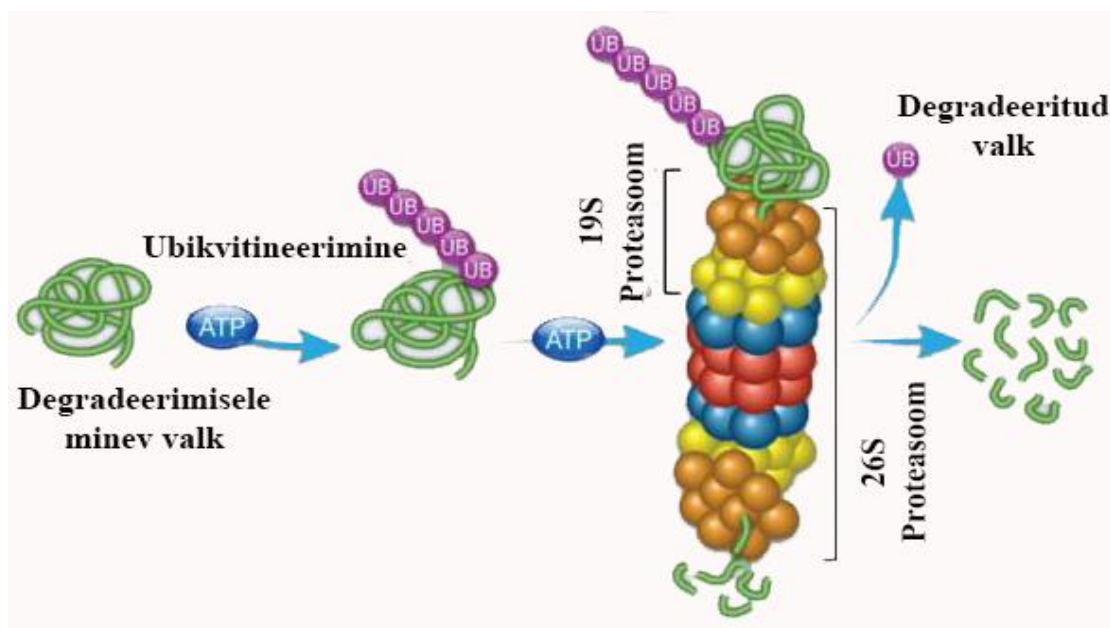
Joonis 6. Ubikvitineerimise protsess. Ubikvitineerimine on etapiviisiline ensümaatiline protsess, milles osalevad kolm ensüümi (E1, E2, E3), mis kannavad ubikvitiini molekuli astmeliselt substraat valgu külge. Modifitseeritud joonis Liu et al. (2014) põhjal.

E3 ensüüm katalüüsib kovalentse isopeptiidsideme teket ubikvitiini C-terminaalse glütsiini (Gly) karboksüülrühma (-COOH) ja substraat valgu sisemise lüsiini (Lys) epsilonaminorühma (ϵ -NH₂) vahel (Hershko & Ciechanover, 1998). Klassikalise polüubikvitiinketi moodustumisel lisatakse järgemööda mitu ubikvitiini ning keti siseselt on ubikvitiini valgud omavahel ühenduses eelneva ubikvitiini Lys48 ning järgneva ubikvitiini Gly76 kaudu (Hershko & Heller, 1985; Hershko & Ciechanover, 1998). Lys48 ning Gly76 kaudu ühenduses olevat ubikvitiinketti nimetatakse

klassikalises "kanooniliseks" vormiks, mis on vajaminev signaal substraat valgu 26S proteosomaalseks lagundamiseks (Hershko & Ciechanover, 1998). KEAP1-NRF2 süsteemis on ubikvitineerimise eelduseks NRF2 ETGE ja DLG motiivide vaheliste lüsiini jääkide õige orientatsioon, mis saavutatakse kui dimeriseerunud sensorvalk KEAP1 NRF2-ga seondub (Zhang et al. 2004; McMahon et al. 2006; Tong et al. 2007). Õiges orientatsioonis olev NRF2 polüubikvitineeritakse KEAP1-CUL3-E3 ubikvitiinligaas kompleksi poolt ning viiakse 26S proteosomaalsele lagundamisele (Zhang et al. 2004; McMahon et al. 2006; Tong et al. 2007).

1.4.1. Proteasoom

Rakus toimub pidevalt erinevate struktuuriliste üksuste taasehitus ning selle tarbeks uute valkude süntees. Samaaegselt eemaldatakse ka oma funktsiooni täitnud, vigased või vale konformatsiooniga valgud. Proteasoomid on evolutsiooniliselt konserveerunud ning kõigis elu domeenides homoloogilised (Baumeister et al., 1998) suured multisubühikulised ja -katalüütilised valk-kompleksid, mis viivad läbi selektiivset valgu degradatsiooni (Bochtler et al., 1999). Eukarüoosis lagundatakse enamik rakusiseseid valke ubikvitiin-sõltuvas valgu degradatsiooni rajas, mida viib läbi 26S proteasoom (Hershko & Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996).



Joonis 7. Valgu proteolüüs 26S proteasoomi poolt. Degradatavale valk ubikvitineeritakse ning valitakse välja 19S regulatoorse partiklite poolt. Seejärel eemaldatakse ubikvitiinmolekulid, volditakse valk lahti ning saadetakse 20S tsentraalkanalisse lagundamisele (Lam et al., 1997; Glickman et al., 1998). Modifitseeritud joonis Ben-Nissan & Sharonz (2014) järgi.

Silindri-kujuline 26S proteasoom koosneb kahest 19S reguleerivast partiklist ning ühest tsentraalsest katalüütilisest 20S partiklist (Hershko & Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996) (Joonis 7). Katalüütiline 20S partikkel koosneb proteaasidest, mille aktiivsentrivid on suunatud silindri keskmesse (Lowe et al., 1995; Groll et al., 1997). Silindri kummaski otsas paiknevad 19S reguleerivad kompleksid, mis selekteerivad degradatsiooniks välja vaid spetsiifiliselt märgistatud valke (DeMartino et al., 1994).

1.5. Replikatiivse helikaasi MCM2–7 subühikud MCM3 ja MCM7 KEAP1 interaktsioonipartneritena

NRF2 kõrval on leitud ka teisi KEAP1-ga interakteeruvaid valke, mis omavad ETGE või sellele sarnast domeeni ning seega pakuvad NRF2-le konkurentsi KEAP1-ga seondumises (Hast et al., 2013). Sarnaselt NRF2-ga seonduvad need valgud KEAP1 Kelch domeeniga. NRF2-ga konkureerivate, ETGE või selle sarnast motiivi sisaldavate, valkude funktsioonid on väga mitmekesised (Hast et al., 2013). Nende hulka kuuluvad DNA replikatsiooni ja litsentseerimise valgud, tsütoskeleti dünaamika eest vastutavad valgud, transkriptsiooni regulaatorid ja apoptoosi valgud (Hast et al., 2013). Konkureerivate valkude seondumine KEAP1-ga võib inhibeerida NRF2 ubiquitineerimist ja proteasomaalset lagundamist ning aktiveerida seeläbi NRF2-st sõltuvat transkriptsiooni ka oksüdatiivse stressita (Hast et al., 2013).

Üheks oluliseks KEAP1 ETGE sõltuvaks interaktsioonipartneriks on ka replikatiivse helikaasi MCM2–7 subühik MCM3 (Hast et al., 2013), mis on leidnud kinnitust ka meie laboris (Ilves, publitseerimata andmed). Lisaks MCM3-le tuvastati meie laboris KEAP1 interaktsioonipartnerina ka replikatiivse helikaasi subühik MCM7, mis aga omab ETGE motiivi asemel sellele sarnast VSGE motiivi (Ilves, publitseerimata andmed). KEAP1 interaktsioon MCM3-ga on tugevam kui MCM7-ga, sest KEAP1 Kelch domeeni afiinsus ETGE motiivi suhtes on kõrgem kui VSGE motiivi puhul (Ilves, publitseerimata andmed). KEAP1 ja MCM3 interaktsiooni leiust innustatuna on meie laboris uuritud ka MCM3 lokaliseerimist ja ubiquitineerimise sõltuvust KEAP1-st ning sellega seotud regulatsiooniradade seost KEAP1 ja NRF2 signaalrajaga.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

NRF2 on kõige enam uuritud KEAP1 interaktsioonipartner ning mehhanism, kuidas NRF2-e regulatsioon vastusena oksüdatiivsele stressile KEAP1 sõltuvalt toimub, on hästi teada. Meie labori huviobjektiks olev replikatiivse helikaasi kompleksi subühik MCM3 interakteerub samuti KEAP1-ga. Uurimaks, kas MCM3 käitumist vastusena oksüdatiivsele stressile saab seostada KEAP1 sõltuva regulatsiooniga, võrreldi käesolevas töös mõlemat interaktsioonipartnerit erinevates genotoksilise stressi tingimustes.

Täpsemalt oli antud bakalaureusetöö eesmärgiks vastata järgmistele küsimustele:

1. Kas MCM3 ja NRF2 valkude lokalisatsiooni ning taseme muutuses vastusena oksüdatiivsele stressile esineb kattuvaid mustreid?
2. Kas MCM3 ja NRF2 valkude ubikvitineerimise muutuses vastusena oksüdatiivsele stressile esineb kattuvaid mustreid?
3. Kuidas mõjuvad erinevad oksüdatiivsed stressorid MCM3 ja NRF2 lokalisatsiooni, taset ja ubikvitineerimist?

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud rakuliin ning selle kasvatamine koekultuuris

Töös kasutati inimese nahast eraldatud ning spontaanselt transformeerunud keratinotsüütide püsirakuliini HaCat. Rakke kasvatati 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidel 10 ml-s söötmes, 5% CO₂ sisaldusega inkubaatoris, temperatuuril 37°C. Rakke kasvatati seerumvabas Cnt Prime (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Šveits) söötmes ning passeeriti iga 3–4 päeva järel, tootja protokoll järgides. Rakkude eemaldamiseks koekultuuri tassi pinnalt kasutati trüpsiin-EDTA lahust. Enne katsete läbiviimist passeeriti rakud 60 mm diameetriga koekultuuri tassidele ning kasvatati 1 ööpäev 5 ml-s söötmes.

2.2.2. Oksüdatiivse stressi ja proteasoomi inhibitsiooni esilekutsumine rakkudes

Indutseerimaks oksüdatiivset stressi inkubeeriti rakke 600 µM või 1000 µM vesinikperoksiidi (H₂O₂) lahusega (Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid). Selleks valmistati vahetult enne

rakkudele lisamist H_2O_2 10 mM vahelahus PBS-is (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4). Lisaks kasutati oksüdatiivse stressi esile kutsumiseks *tert*-butüülhüdrokinooni (tBHQ; Sigma Aldrich) ja kaaliumbromaat (KBrO₃; Sigma Aldrich). Kummastki tehti esmalt 200 mM vahelahus, tBHQ puhul dimetüülsulfoksiidis (DMSO; Panreac AppliChem, Saksamaa) ning KBrO₃ puhul deioniseeritud vees (Milli-Q). Söötmesse lisati 200 mM lahust nii, et saavutada lõppkontsentratsioon tBHQ jaoks 50 µM ja KBrO₃ jaoks 10 mM. Proteasoomi inhibeerimiseks kasutati 20 µM lõppkontsentratsiooniga MG132 (Calbiochem, Ameerika Ühendriigid) ja bortezomib (Santa Cruz Biotechnology, Ameerika Ühendriigid) proteasoomi inhibiitorite lahuseid, millest tehti vahetult enne rakkudele lisamist vahelahjendused soojas söötmes. Kuna proteasoomi inhibiitorite lahused olid DMSO-s, siis esimestes katsetes hinnati ka seda, kas DMSO omab täiendavat mõju rakkudele. Rakke inkubeeriti proteasoomi inhibiitorite, H_2O_2 , DMSO (negatiivne kontroll) ja tBHQ- ga olenevalt katsest kas 6 h või 13 h. KBrO₃-ga inkubeeriti rakke 1,5 h.

2.2.3. Rakkude fraktsioneerimine

Rakke fraktsioneeriti kahe erineva protokolliga alusel, esimene neist jaotas rakud kaheks ning teine viieks fraktsiooniks. Kahe fraktsiooni fraktsioneerimisel lahutati rakud lahustuvaks (ingl *soluble*, S) ja sadestunud (ingl *pellet*, P) fraktsiooniks. S fraktsioon on rikastatud raku lahustuvate komponentidega ning P fraktsioon sisaldab endas kromatiini ja ka tsütoskeleti (Symeonidou *et al.*, 2013). Fraktsioneerimise eelselt passeeriti rakkud 60 mm tassidele ning lubati 1 ööpäev kasvada. 6 või 13 h enne rakkude kogumist lisati oksüdatiivset stressi indutseerivad ühendid, proteasoomi inhibiitorid või DMSO kontroll. Katsetes, kus kasutati KBrO₃, lisati lahus 1,5 h enne rakkude kogumist. Enne rakkude kogumist eemaldati sööde ning rakud pesti 1x PBS-ga. Rakud eemaldati koekultuuri tassi pinnalt trüpsineerimisega (trüpsiin-EDTA lahus), trüpsiin inhibeeriti 10% veise loote seerumiga PBS lahuses. Kogutud rakud tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge 5415R, edasised tsentrifuugimised sama masinaga) toatemperatuuril 500 g juures põhja. Rakkude kogumisele järgnes täiendav pesu 1x PBS-is ja tsentrifuugimine 500 g juures. Supernatant eemaldati, seejärel suspendeeriti proove 150 µl-is jääkülmas CSK (ingl *cytoskeleton*)-Triton puhvris (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 300 mM sahharoos, 0,1 % Triton X-100, 10 mM β -glütserofosfaat, 10 mM NaF, pH 7,9), millesse oli vahetult enne lisatud proteaasi inhibiitorid 1x *Roche Protease Inhibitor mix* ning 1 mM PMSF (ingl *phenylmethanesulfonylfluoride*). Järgnes 15 minutiline inkubatsioon jääl ning edasi 15 minutiline

tsentrifuugimine 16 000 g ja 4°C juures. Lahustuva fraktsiooni saamiseks eemaldati tsentrifuugitud proovidest 130 µl supernatanti, see tõsteti puhtasse ependorfi tuubi ning lisati 26 µl 6x Laemmli puhvrit (60 % glütserool, 300 mM TrisHCl pH 6,8, 864 mM β-merkaptotetanool, 12 % SDS, 01 % broomfenoolsinine, 12 mM EDTA pH 8,0). Lahustumatu fraktsiooni saamiseks eemaldati sademelt ülejäänud supernatant ning pesti alles jäänud sadet 200 µl CSK-Triton puhvriga suspendeerides, järgnes 15 minutiline tsentrifuugimine 16 000 g ja 4°C juures. CSK puhver eemaldati ning sade suspendeeriti 60 µl 2x Laemmli puhvril. Ühtlase suspensiooni saamiseks ning valkude denatureerimiseks keedeti Laemmli puhvriga suspendeeritud proove 100°C juures 5 minutit, sellele järgnes segamine *vortex* masinal (Scientific Industries Vortex-Genie 2, Ameerika Ühendriigid, edaspidi sama). Lahustumatu fraktsiooni proovide disperseerimiseks sonikeeriti proovid ultraheliga 4°C juures. Saadud proove analüüsiti *Western blot*'i abil.

Rakkude täpsemaks analüüsiks kasutati ka viie fraktsiooni fraktsioneerimise protokoll (Thermo Fisher, *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells*, Ameerika Ühendriigid), mis eraldas rakulüsaadi tsütoplasma (CPE), membraani (ME), lahustuva tuuma (SNE), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ning tsütoskeleti (CySk) fraktsiooniks. Fraktsioneerimise eelselt passeeriti rakud 60 mm koekultuuri tassidele ning peale 1 ööpäevast kasvamist lisati rakkudele, kas 6 või 13 tunni pikkuseks inkubatsiooniks stressoreid, proteasoomi inhibiitoreid ja vastavalt katsele ka DMSO lahust. Rakud koguti eelpool kirjeldatud meetodil. Kogumise järgselt tsentrifuugiti proovid 200 g juures 5 min toatemperatuuril, pesti 1x PBS lahusega ning tsentrifuugiti taas 5 min toatemperatuuril 200 g juures. Edasine fraktsioneerimine järgis tootjapoolset protokoll. Iga eraldatud fraktsioon asetati jääle seniks, kuni lisati 6x SDS Laemmli puhver. 100 µl mahuga proovidele lisati 20 µl 6x SDS Laemmli puhvrit ning 50 µl mahuga proovidele lisati 10 µl 6x SDS Laemmli puhvrit. Proovide homogeniseerimiseks ja valkude degradeerimiseks keedeti proovid 100°C juures 5 minutit, millele järgnes hoogne segamine *vortex* masinal. Saadud proove kasutati *Western blot* analüüsis.

2.2.4. Western blot analüüs

Fraktsioneeritud proovide analüüsimiseks kasutati *Western blot* meetodit. Valgud lahutati geelelektroforeesil SDS-polüakrüülamiidgeelis ning kanti üle, eelnevalt metanooliga aktiveeritud, PVDF membraanile (Millipore, Ameerika Ühendriigid) poolkuiva ülekande meetodit kasutades (Green & Sambrook, 2012). Valgu suuruse alusel lahutati proovid MCM3, NRF2 ja KEAP1

valkude uurimiseks 10 % geelis ning γ -H2A.X valgu uurimiseks 15 % geelis. S ja P fraktsiooni proovide uurimiseks laeti geelile 5 μ l lahustuva fraktsiooni proove ning 10 μ l lahustumatu fraktsiooni proove. 5 fraktsiooni fraktsioneerimise proovide analüüsi jaoks laeti geelile 10 μ l proovi. Elektrofooresile järgnes 45 min – 1,5 h ülekanne 12 V juures. Membraan blokeeriti seejärel 5 % lõssilahuses TBS-Tween 20 lahuses (50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) toatemperatuuril 1 tund või maksimaalselt 1 ööpäev. Blokeerimisele järgnes primaarse antikeha töötlus 2 % lõssilahuses, membraani inkubeeriti 1 h toatemperatuuril või 1 ööpäev 4°C juures loksutil. Seejärel pesti membraani minimaalselt 3x10 min *Western blot* pesulahuses [50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20] loksutades. Pärast pesu töödeldi membraani sekundaarse antikehaga 2 % lõssilahuses 1 h jooksul toatemperatuuril loksutil. Sekundaarse antikeha töötlusele järgnes pesu minimaalselt 3x10 min. Signaal detekteeriti kasutades vastavalt vajadusele kas ECL (Amersham, GE Healthcare, Suurbritannia) või Femto Super Signal (Thermo Fisher Scientific) ilmutusreagentide komplekti, töödeldud membraan eksponeeriti röntgenfilmile (AGFA Healthcare, Belgia). Filmid skaneeriti arvutisse ning töödeldi Adobe Photoshop-i ja Adobe Illustrator programmiga (Adobe Systems, Ameerika Ühendriigid). Valgu üldise hulga hindamiseks eri proovides kasutati ka valkudega kaetud membraani töötlust kolloidse kullavärviga. Esmalt inkubeeriti membraani deioniseeritud vees lahjendatud 10 %-lise NP40 (Sigma-Aldrich) lahusega minimaalselt 20 minuti jooksul toatemperatuuril loksutil. Seejärel loputati membraani 5x5 minutit destilleeritud vees ning inkubeeriti *Colloid Gold Total Protein Stain* kullavärviga (Bio-Rad, Ameerika Ühendriigid) üleöö toatemperatuuril. Töötluse järgselt membraanid loputati mõned korrad destilleeritud vees, kuivatati ning skaneeriti arvutisse.

Tabel 1. Töös kasutatud antikehad, nende lahjendused ning tootjad

Primaarne antikeha		Tootja	Lahjendus	Sekundaarne antikeha	Tootja	Lahjendus
anti-MCM3 (sc-9850)	kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology Ameerika Ühendriigid	1:200	Küülikus toodetud kitse IgG vastane	LabAS, Eesti	1:5000
anti-NRF2 (sc-722)	küüliku polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Kitses toodetud küüliku IgG vastane	LabAS	1:5000
anti-NRF2 (sc-365949)	hiire monokloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Kitses toodetud hiire IgG vastane	LabAS	1:5000
anit-KEAP1 (sc-365626)	hiire monokloonaalne IgG _{2b}	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Kitses toodetud hiire IgG _{2b} vastane	LabAS	1:5000
anti- γ -H2A.X (ab-22551)	hiire monokloonaalne IgG ₁	Abcam, Suurbritannia	1:1000	Kitses toodetud hiire IgG ₁ vastane	LabAS	1:5000

2.3. Tulemused

Antud uurimustöö eesmärgiks oli võrrelda, kas MCM3 ja NRF2-e lokalisatsiooni muutus ning ubikvitineerimine käituvad oksüdatiivse stressi korral sarnaselt. Nii MCM3 kui ka NRF2 valgud interakteeruvad oksüdatiivse stressi sensorvalgu KEAP1-ga nendes valkudes sisalduva konserveerunud ETGE juuksenõela vahendusel (Hast et al., 2013). Kuna MCM3 taseme kaudu on võimalik reguleerida ka kogu MCM2–7 helikaasi kompleksi laadimist kromatiinile (Chuang et al., 2012), võib MCM3 ja NRF2 valgu võrdlemine selgitada KEAP1-e rolli DNA replikatsiooni regulatsioonis oksüdatiivse stressi tingimustes.

MCM3, NRF2 ja KEAP1-e taseme, lokalisatsiooni ning MCM3 ja NRF2-e puhul ka ubikvitineerimise uurimiseks teostati eelkatsed kolmes rakuliinis – inimese sääreлуу osteosarkoomist eraldatud U2OS, inimese embrüonaalsetest neerurakkudest eraldatud HEK293 ja HaCat rakuliinis. Kõige selgemini tuli oksüdatiivsest stressist sõltuv NRF2 valgu stabiliseerumine välja HaCat rakkudes, mistõttu jätkati edasisi katseid antud rakuliiniga ning töös esitatakse selguse mõttes ainult neid tulemusi. Lisaks on HaCat rakud säilitanud normaalse diferentseerumise võime (Boukamp et al., 1988), seega pole antud rakuliin laboritingimustes kultiveerimise käigus geneetiliselt väga suuri muutusi läbinud, mis on regulatoorsete radade uurimiseks oluline lähtepunkt.

2.3.1. MCM3 ja NRF2 valkude taseme ja lokalisatsiooni muutus H₂O₂ ning proteasoomi inhibiitorite toimetel

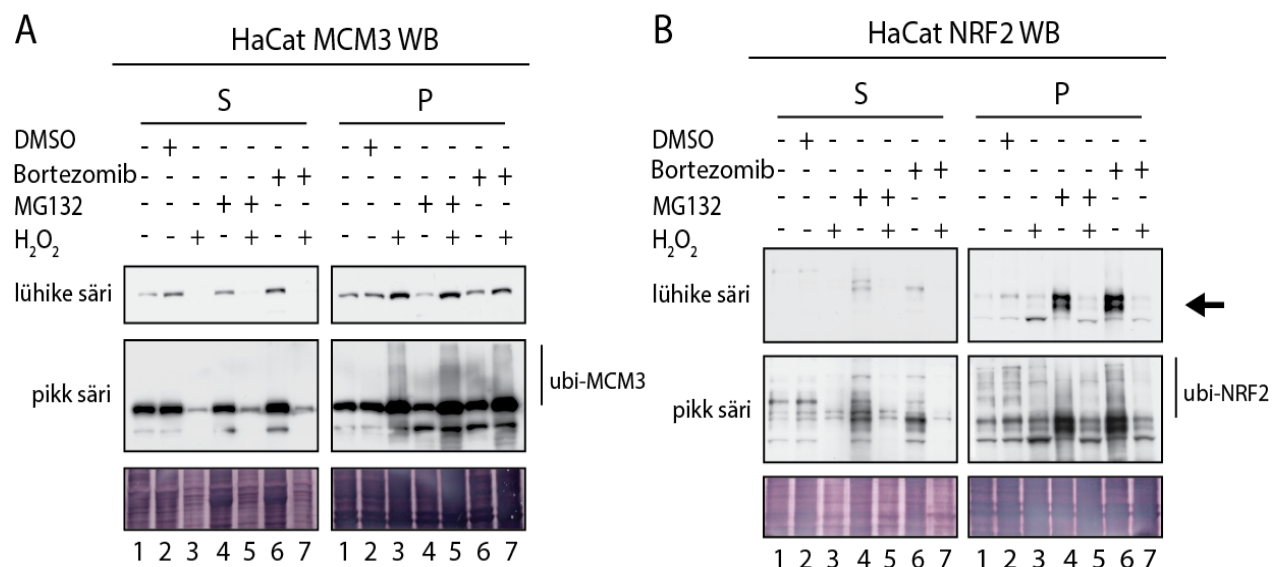
Oksüdatiivse stressi tekitajana kasutati esmalt vesinikperoksiidi (H₂O₂). Vesinikperoksiid on endogeenselt produtseeritav ühend, mida toodetakse paljudes rakulistes radades (Boveris et al., 1972), kuid see hoitakse rakuliste antioksidantidega pidevalt kontrolli all. Kui tasakaal läheb paigast ära ning vesinikperoksiidi hulk rakus suureneb, võib tekkida oksüdatiivne stress. Eksperimentaalsetes mudelites on H₂O₂ üks enamkasutatavaid oksüdatiivse stressi indutseerijaid, sest see on suhteliselt stabiilne ja difundeerub rakus hästi (Chance et al., 1979). Nägemaks, kas ja kuidas koguneb rakkudes MCM3 ja NRF2 ubikvitineeritud vorm, kasutati ka inhibiitoreid MG132 ja bortezomib, mis blokeerivad ubikvitineeritud valkude proteasomaalset lagundamist 26S proteasoomi poolt.

MCM3 ja NRF2-e lokalisatsiooni muutuste tuvastamiseks kasutati esialgu protokoll, mis eraldab rakulüsaadi lahustuvaks (S) ja kromatiiniga rikastatud lahustumatuks (P) fraktsiooniks. P fraktsioon sisaldab lisaks kromatiinile ka tsütoskeleti ning teisi raskestilahustuvaid rakulisi kompartimente (Symeonidou et al., 2013). S fraktsioon sisaldab kõiki tuuma ja tsütosooli lahustuvaid või ankurdamata valke ja komplekse (Symeonidou et al., 2013). Esimeses katses inkubeeriti HaCat rakke 13 tunni jooksul H_2O_2 , proteasoomi inhibiitorite ja DMSO-ga. H_2O_2 lisati rakkudele 1000 μM lõppkontsentratsiooniga kas üksi või kombinatsioonis proteasoomi inhibiitoritega (MG132 või bortezomib), mille lõppkontsentratsioon oli 20 μM .

Katse tulemustest selgus, et MCM3 koguneb kromatiiniga rikastatud lahustumatu (P) fraktsiooni proovi neis rakkudes, mida inkubeeriti H_2O_2 -ga (Joonis 8A, P töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H_2O_2 töötlemisega proovid 3, 5, 7). Samaaegselt langeb MCM3 tase lahustavas (S) fraktsioonis (Joonis 8A, S, töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H_2O_2 töötlemisega proovid 3, 5, 7). Need tulemused kinnitavad meie laboris varasemalt saadud tulemusi (Ilves, publitseerimata andmed). Proteasoomi inhibiitoritega üksi inkubeeritud proovides MCM3 lokalisatsioon ja tase ei muutu, vaid sarnaneb negatiivse ja DMSO kontrolliga (Joonis 8A, S ja P töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs MG132 ja bortezomibi töötlemisega proovid 4, 6). NRF2 tase on kõrgem proovides, mida inkubeeriti proteasoomi inhibiitoritega seda nii lahustumatus (P) ning nõrgalt ka lahustavas (S) fraktsioonis (Joonis 8B, S ja P töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs MG132 ja bortezomibi töötlemisega proovid 4, 6) ning erinevalt MCM3-st ei tundu H_2O_2 NRF2 taseme regulatsioonis rolli mängivat (Joonis 8B, S, P töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H_2O_2 töötlemisega proovid 3, 5, 7).

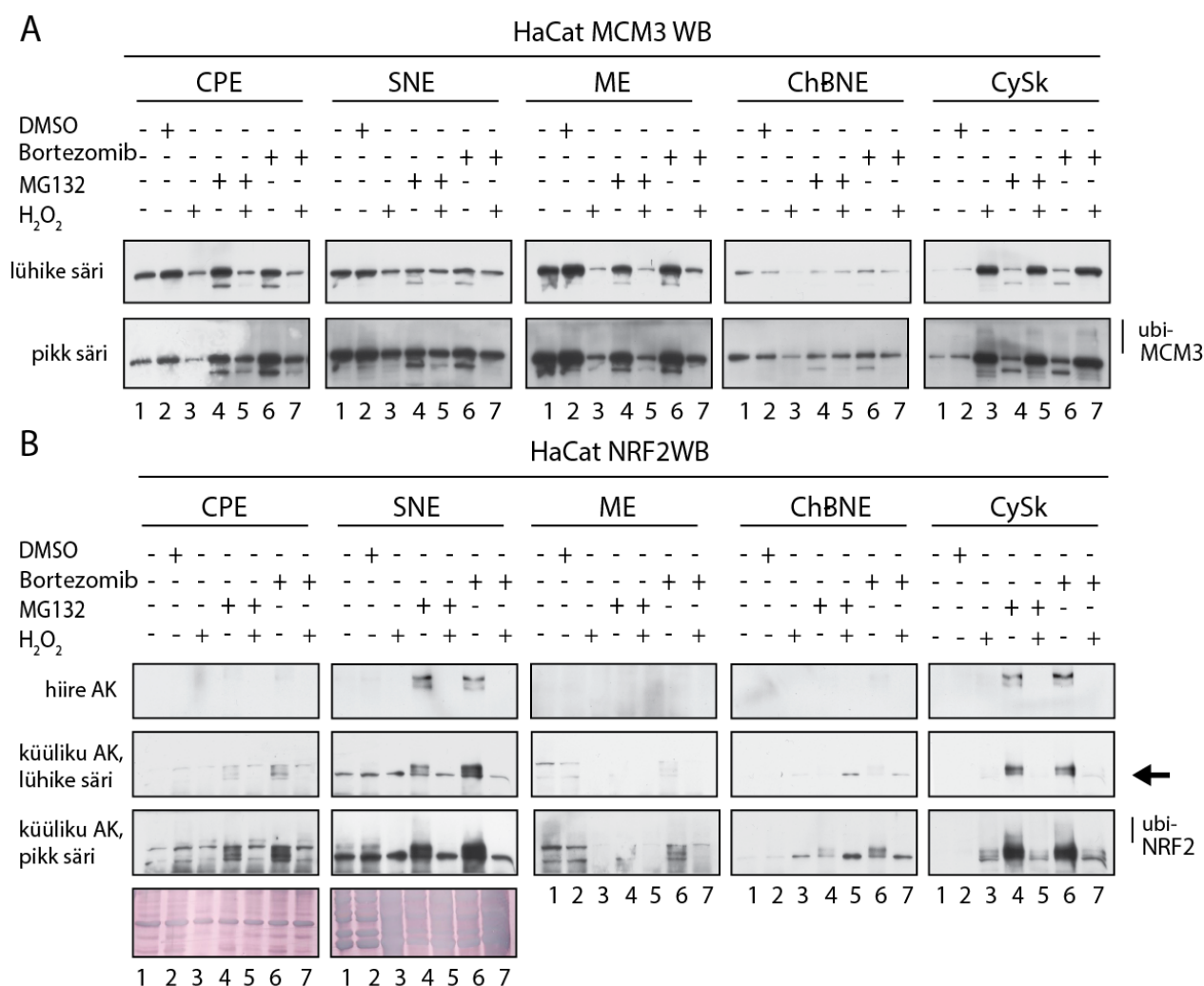
Eelpool kirjeldatud katses kasutati kahe fraktsiooni fraktsioneerimise protokoll, mis on lihtsam ja väiksema lahutusvõimega, kuid annab hea esmase ülevaate valkude rakulise lokalisatsiooni kohta. Suurema spetsiifilisuse saamiseks jätkati edasistes katsetes fraktsioneerimise protokolliga, mis jaotab rakulüsaadi järgnevalt: tsütoplasma (CPE), membraani (ME), lahustuva tuuma (SNE), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ning tsütoskeleti (CySk) fraktsiooniks. Samuti kasutati eelpool kirjeldatud katses kõrget H_2O_2 kontsentratsiooni ning pikka inkubatsiooniaega, et näha selget ja tugevat efekti ning muutusi, mida ka nähti. Kuna on aga teada, et 1000 μM H_2O_2 -i kontsentratsioon ning liiga pikk inkubatsiooniaeg võib rakkudes esile kutsuda apoptoosi (Wiese et al., 1995), siis jätkati edasisi katseid madalama (600 μM) H_2O_2 kontsentratsiooniga. Samal põhjusel kasutati järgnevates katsetes 13 h (joonised 8–10) inkubatsiooniaja kõrval ka lühemat – 6 h – inkubatsiooniaega (joonised 11, 12). Eesmärgiks oli vältida võimalikke apoptoosist ja

rakutsükli blokeerimisest tulenevaid sekundaarseid efekte ning näha vaid oksüdatiivse stressi vastusradadega seotud kiiremaid efekte.



Joonis 8. MCM3 ja NRF2 valgu taseme ja lokalisatsiooni muutus H₂O₂ toimel. Lahustuva (S) ja lahustumatu (P) fraktsiooni *Western blot* analüüs MCM3 või NRF2-e vastaste antikehadega. NRF2 puhul kasutati küülikus toodetud primaarseid antikehi. NRF2 valk on detekteeritav kaksikbändina (Lau et al., 2013), millele viitab nool (edaspidid sama). Analüüsitavaid rakke inkubeeriti 13 h jooksul 1000 µM H₂O₂-ga. Näha on ka mõlema valgu eeldatavaid ubikvitineerimise redeleid. Võrdluseks on toodud lühem ja pikem säriaeg ning üldise valgu taseme hindamiseks kullaga värvitud membraanid. *Western blot* analüüs viidi läbi ühe katse proovidega ühe korra.

Põhjalikumat fraktsioneerimise protokollit kasutades kinnitati meie labori varasemaid tulemusi, kus H₂O₂ juuresolekul koguneb MCM3 tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis (Joonis 9A, Cysk töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H₂O₂ töötlusega proovid 3, 5, 7). Sellega kaasnevalt langeb MCM3 tase teistes lahustuvates fraktsioonides, mis on selgelt täheldatav pikema inkubatsiooniajaga katses ning eriti märgatavalt tsütoplasma (CPE) ja membraani (ME), nõrgemalt ka lahustuva tuuma (SNE) fraktsioonis (Joonis 9A, CPE, SNE, ME töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H₂O₂ töötlusega proovid 3, 5, 7). Ilmselt jõuab lühema inkubatsiooniaja ning madalama H₂O₂-i kontsentratsiooniga MCM3 kogunemine tsütoskeletile alata, kuid võimalik, et esmalt toimub kuhjumine värselt sünteesitava MCM3 valgu arvelt ning hiljem järgneb aktiivne valgu korjamine tsütoskeletile ka teiste fraktsioonide arvelt. Nagu kahe fraktsiooni protokollil puhul, selgus ka nüüd, et proteasoomi inhibiitorid ei mõjuta H₂O₂ poolt põhjustatud MCM3 lokalisatsiooni muutusi (Joonis 9A, H₂O₂ töötlusega proov 3 vs H₂O₂ ja MG132/bortezomibi töötlusega proovid 5, 7).

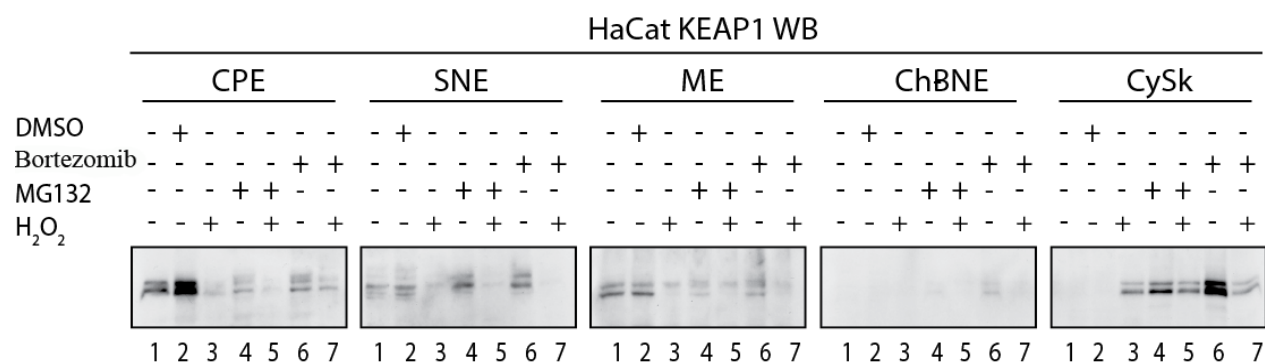


Joonis 9. MCM3 ja NRF2 valgu taseme ning lokalisatsiooni muutus H₂O₂ toimet. Tsütoplasma (CPE), lahustuva tuuma (SNE), membraani (ME), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ja tsütoskeleti (CySk) fraktsioonide *Western blot* analüüs MCM3 või NRF2-e vastaste antikehadega. NRF2-e puhul on kasutatud kahte erinevat primaarset antikeha – hiire või küülikus toodetud – kinnitamaks NRF2-e õiget bändi. Analüüsitavaid rakke inkubeeriti 13 h jooksul 600 µM H₂O₂-ga. Näha on ka MCM3 ja NRF2-e eeldatavaid ubikvitineerimise redeleid. Välja on toodud lühem ja pikem säriaeg ning NRF2-e jaoks ka kullaga värvitud membraanid. MCM3-e pikema säriajaga röntgenfilm, CPE fraktsiooni piirkonnas, on saanud kahjustada *Western blot* viidi läbi ühe katse proovidega ühe korra.

NRF2-e puhul täpsustas viie fraktsiooni fraktsioneerimise protokoll, et NRF2 koguneb vaid proteasoomi inhibiitoritega inkubeeritud proovides kõigis viies uuritud fraktsioonis. Kõige enam aga tsütoplasma (CPE), lahustuva tuuma (SNE) ning tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis (Joonis 9B, CPE, SNE, CySk töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs MG132/bortezomibi töötlusega proovid 4, 6; Joonis 11B, CPE, SNE, CySk töötlemata proov 1 vs MG132 töötlusega proov 3). H₂O₂ lisamisel tõuseb NRF2-e tase vaid tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis (Joonis 9B, CySk töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H₂O₂ töötlusega proovid 3, 5, 7; Joonis 11B, CySk töötlemata proov 1

vs H₂O₂ töötusega proovid 2, 4). Kõikides fraktsioonides võtab H₂O₂-i lisamine langetab proteasoomi inhibiitori efekti NRF2 tasemele, seda ka tsütoskeletil, kus NRF2 tase tõuseb H₂O₂-i ja proteasoomi inhibiitoriga kombineeritud proovi puhul samale tasemele kui H₂O₂-ga üksi, mis on aga oluliselt madalam kui MG132 või bortezomibiga üksi (Joonis 9B, CySk MG132/bortezomibi töötusega proovid 4, 6 vs H₂O₂ ja MG132/bortezomibi töötusega proovid 5, 7; Joonis 11B, CySk MG132 töötusega proov 3 vs H₂O₂ ja MG132 töötusega proov 4).

Samades katsetes analüüsitud KEAP1-e, kui NRF2-e ja võimaliku MCM3-e regulaatori, tase on üleval vaid tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis ja seda nii H₂O₂ kui ka proteasoomi inhibiitorite juuresolekul (Joonis 10, CySk töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs H₂O₂ ja/või MG132/bortezomibi töötusega proovid 3–7; Joonis 11 CySk töötlemata proov 1, vs H₂O₂ ja/või MG132 töötusega proovid 2, 3, 4, 6). Pikema inkubatsiooniajaga katses on näha, et raku lahustuvates fraktsioonides – tsütoplasma (CPE), lahustuva tuuma (SNE) ja membraani (ME) fraktsioonis – langeb KEAP1-e tase H₂O₂ lisamisel, seda ka koos proteasoomi inhibiitoritega kombineeritud proovides (Joonis 10, CPE, SNE, ME töötlemata proov 1 vs H₂O₂ ja MG132/bortezomibi töötusega proovid 3, 5, 7). Lühema inkubatsiooniajaga katses KEAP1-e taseme langus lahustuvates fraktsioonides on oluliselt nõrgem ja vähem märgatavam (Joonis 11, ME töötlemata proov 1 vs H₂O₂ ja MG132 töötusega proovid 2, 4, 6).



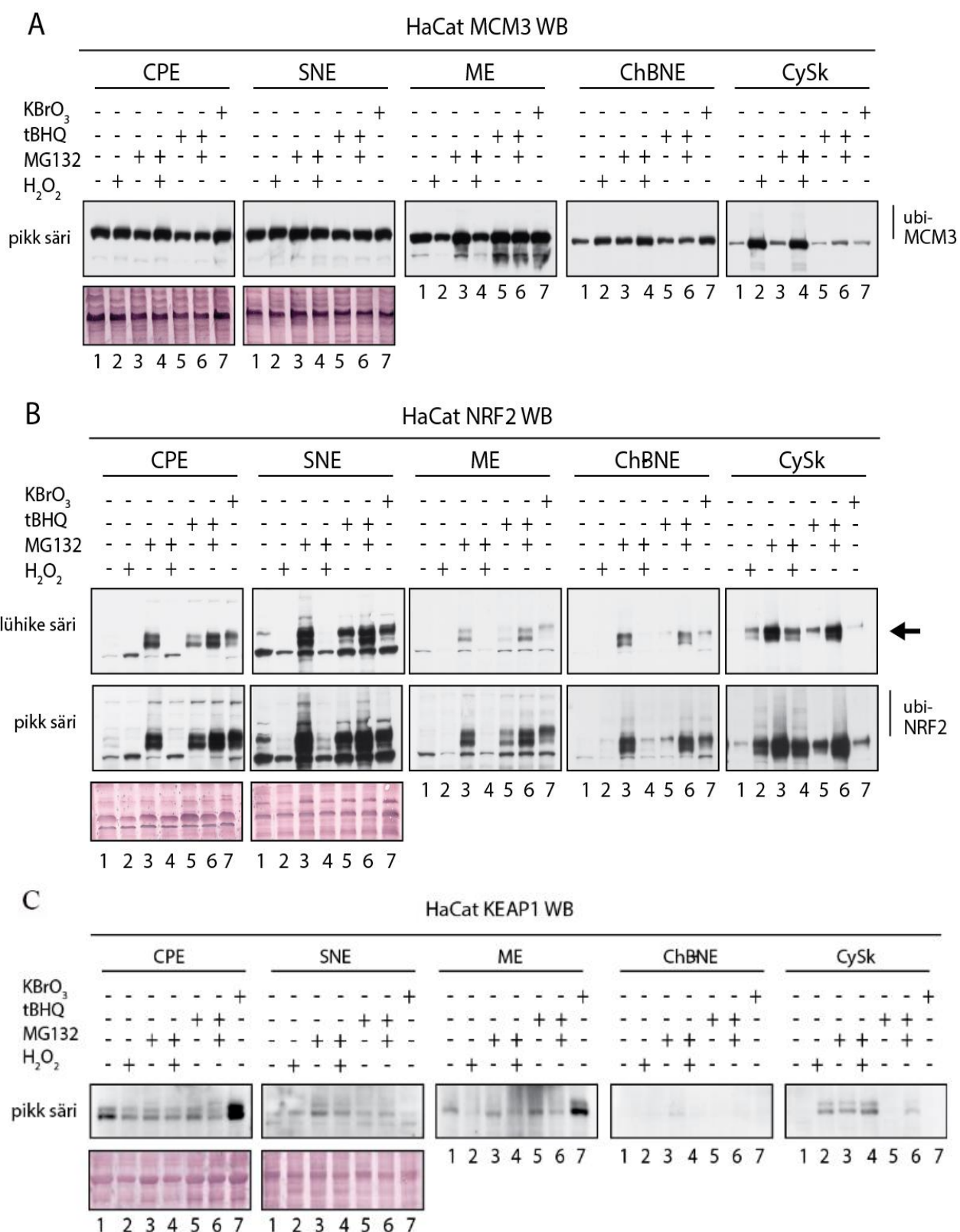
Joonis 10. KEAP1 valgu taseme ja lokalisatsiooni muutus H₂O₂ toimel. Tsütoplasma (CPE), lahustuva tuuma (SNE), membraani (ME), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ja tsütoskeleti (CySk) fraktsioonide *Western blot* analüüs KEAP1 vastaste antikehadega. Analüüsitavaid rakke inkubeeriti 13 h jooksul 600 µM H₂O₂-ga. CPE fraktsioonis DMSO kontrolli puhul nähtud kõrgem KEAP1 tase võrreldes DMSO-ta kontrollrajaga (võrdle radu 2 ja 1) ei kordunud hilisemates katsetes ja on tõenäoliselt konkreetse katseseeria iseärasus. DMSO kontroll teostati seetõttu, et kasutatavate proteasoomi inhibiitorite lahused olid lahustunud DMSO-s ning sooviti hinnata, kas DMSO omab ise täiendavat mõju rakkudele. *Western blot* viidi läbi ühe katse proovidega ühe korra.

2.3.2. Teiste oksüdatiivsete stressorite mõju MCM3 ja NRF2 valkude tasemele ning lokalisatsioonile võrreldes H₂O₂-ga

Uurimaks, kuidas mõjuvad erinevad stressorid MCM3 ja NRF2-e tasemele, lokalisatsioonile ja ubikvitineerimisele võeti kasutusele H₂O₂ kõrval ka *tert*-butüülhüdrokeinon (tBHQ) ja kaaliumbromaat (KBrO₃), lõppkontsentratsiooniga vastavalt 50 µM ja 10 mM. tBHQ on sünteetiline fenoolne ühend, mida kasutatakse laialdaselt KEAP1-NRF2 raja elektrofiilseks aktiveerimiseks. Tegemist on klassikalise ksenobiootilise KEAP1 aktivaatoriga, mis modifitseerib KEAP1-e reaktiivseid tsüsteiinjääke otse (McMahon et al., 2010) või indutseerib kaudset ROS-ide produktsiooni rakus (Imhoff & Hansen, 2010). KBrO₃ on unikaalne genotoksiline ning kantserogeenne ühend, mis oma toimemehhanismilt erineb teistest oksüdantidest, kuid tekitab ROS-idega sarnaseid DNA kahjustusi (Ballmaier & Epe, 1995; Ballmaier & Epe, 2006). Antud stressorid toodi kasutusse eesmärgil võrrelda nende mõju H₂O₂-ga. Edasistest katsetest eemaldati üks proteasoomi inhibiitoritest (bortezomib) ning jätkati vaid MG132-ga, kuna eelnevate katsete jooksul käitusid mõlemad inhibiitorid samamoodi. Lisaks lühendati ka inkubatsiooniaega 6-le tunnile, et vähendada võimalike sekundaarsete stressivastuste mõju.

Üheski fraktsioonis ei tuvastatud MCM3-e taseme või lokalisatsiooni muutust tBHQ või KBrO₃-i toimel (Joonis 11A töötlemata proov 1 vs tBHQ ja KBrO₃ töötlemisega proovid 5, 6, 7) ning tundub, et vaid H₂O₂ on spetsiifiline MCM3 taseme tõstja tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis (Joonis 11A, CySk töötlemata proov 1 vs H₂O₂ töötlemisega proovid 2, 4). NRF2 puhul tuvastati, et tBHQ ning KBrO₃ mõjuvad rakkudele üsna sarnaselt, viies NRF2-e taseme üles kõige enam lahustuva tuuma (SNE) ja tsütoplasma (CPE) fraktsioonis, teistes fraktsioonides nõrgemalt (Joonis 11B, CPE, SNE töötlemata proov 1 vs tBHQ või KBrO₃ töödeldud proovid 5, 7).

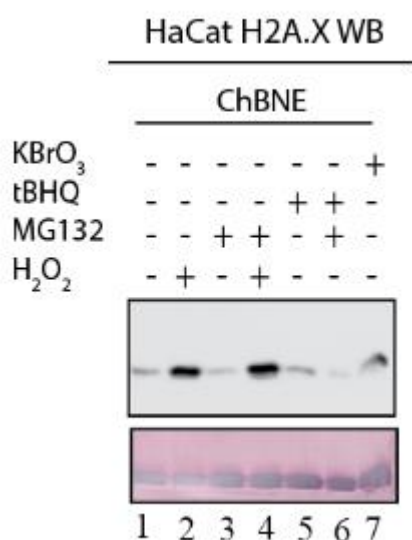
Nii NRF2 kui ka KEAP1 valgu tasemete vaatlemisel on näha, et tBHQ lisamine MG132-le tõstab valgu hulka kõigis fraktsioonides samale tasemele, mis esineb MG132-ga üksi, seega võib eeldada, et MG132 efekt domineerib tBHQ-i efekti üle või täiendab seda (Joonis 11B ja 11C, MG132 töötlemisega proov 3 vs tBHQ ja MG132 töötlemisega proov 6). KEAP1 puhul ei näi tBHQ omavat erilist efekti valgu taseme või lokalisatsiooni muutmises. Huvitav toime on aga KBrO₃-il, mis suurendab KEAP1-e taset tsütoplasma (CPE) fraktsioonis tugevalt, veidi nõrgemalt ka membraani (ME) fraktsioonis (Joonis 11C, CPE, ME töötlemata proov 1 vs KBrO₃-ga töötlemisega proov 7).



Joonis 11. MCM3, NRF2 ja KEAP1 valgu taseme ning lokalisatsiooni muutus erinevate stressorite mõjul Tsütoplasma (CPE), lahustuva tuuma (SNE), membraani (ME), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ja tsütoskeleti (CySk) fraktsioonide *Western blot* analüüs MCM3, NRF2 või KEAP1 vastaste

antikehadega. Analüüsitavaid rakke inkubeeriti 6 h jooksul 600 μM H_2O_2 -ga, 50 μM tBHQ või 10 mM KBrO_3 -ga. Valgu üldhulga hindamiseks on välja toodud kollaga värvitud membraanid. Näha on ka MCM3 ja NRF2 valgu eeldatavaid ubikvitineerimise redeleid. *Western blot* viidi läbi ühe katse proovidega. Tulemused kordusid kahe katse *Western blot* analüüsides.

DNA kahjustustega aktiveeruvad erinevad regulatoorsed rajad (Ciccia & Elledge, 2010), mis võivad mõjutada ka MCM valkude regulatsiooni. Uurimaks, kas antud töös kasutatud stressorid kutsuvad esile DNA kahjustusi, vaadati histooni H2A fosforüleeritud vormi $\gamma\text{-H2A.X}$ moodustumist, mis on DNA kaheaheelaliste katkete tekke indikaator (Rogakou et al., 1998) Selgus, et $\gamma\text{-H2A.X}$ tase suureneb kromatiini fraktsioonis ainult H_2O_2 ja KBrO_3 -i juuresolekul, seega tekitavad need stressorid DNA kahjustusi (Joonis 12).



Joonis 12. Oksüdatiivse stressi poolt indutseeritud DNA kahjustus. Kromatiiniga seotud tuuma (ChBNE) fraktsiooni *Western blot* analüüs $\gamma\text{-H2A.X}$ vastaste antikehadega. Analüüsitavaid rakke inkubeeriti 6 h jooksul 600 μM H_2O_2 -ga, 50 μM tBHQ või 10 mM KBrO_3 -ga. Valgu üldhulga hindamiseks on välja toodud kollaga värvitud membraan. *Western blot* viidi läbi ühe katse proovidega üks kord.

2.3.3. MCM3 ja NRF2 valgu ubikvitineerimine erinevates rakufraktsioonides oksüdatiivse stressi toimet

KEAP1 reguleerib NRF2-e taset valdavalt oma interaktsioonipartneri ubikvitineerimisega, mis viib märgistatud NRF2-e edasisele 26S proteasomaalsele degradatsioonile. Sellest teadmisest ajendatuna analüüsiti MCM3 ja NRF2 valgu võimalikku ubikvitineerimist proteasoomi inhibiitoritega üksi või kombinatsioonis stressoritega ja võrreldi inhibiitorita kontrollrakkudega. Eesmärgiks oli tuvastada võimalikku ubikvitineerimise tasemel regulatsiooni. Valgu

potentsiaalset ubikvitineerimist tuvastati *Western blot*'i analüüsi abil. Ubikvitineeritud valgu molekulmass suureneb sellega kovalentselt seotud erineva arvu ubikvitiin molekulide võrra, mis on nähtav modifitseerimata valgu bändist kõrgemale jääva aeglasemalt liikuvate bändide redelina (Cheng et al., 2002).

MCM3-e eeldatavat ubikvitineerimise redelit on esimest fraktsioneerimise protokolliga kasutades näha sadenenud valkude (P) fraktsiooni proovides, mis olid inkubeeritud ainult H_2O_2 -ga või kombinatsioonis proteasoomi inhibiitoritega (Joonis 8A, P töötlemata ja DMSO proovid 1 ja 2 vs H_2O_2 -ga ja MG132/bortezomibi töötlusega proovid 3, 5, 7). Proteasoomi inhibiitorid ei võimendanud tekkinud redeli intensiivsust. Täpsema fraktsioneerimise protokolliga on näha, et ubikvitineerimine esineb tsütoskeletil (Joonis 9A, CySk H_2O_2 töötlusega proovid 3, 5, 7; Joonis 11A CySk, H_2O_2 töötlusega proovid 2, 4). Kõrgema H_2O_2 kontsentratsiooni ning pikema inkubatsiooniajaga on redelid intensiivsemad, seda ilmselt tugevamad stressivastuse tõttu.

Kahe fraktsiooni protokolliga kasutades on NRF2 eeldatavat ubikvitineerimise redelit kõige tugevamini näha proteasoomi inhibiitoritega inkubeeritud proovides, seda lahustumatus (P) ning nõrgemalt ka lahustuv (S) fraktsioonis (Joonis 8B, S ja P töötlemata ja DMSO proovid 1, 2 vs MG132/bortezomibi töötlusega proovid 4, 6). Viie fraktsiooni fraktsioneerimise protokoll täpsustas redelite asukohaks tsütoskeleti (CySk) ja lahustuva tuuma (SNE) fraktsioonid (Joonis 9B, CySk, SNE MG132/bortezomibi töötlusega proovid 4, 6). tBHQ ja $KBrO_3$ -i efekti uurimisel selgus, et ubikvitineerimise redel lisandub ka nendele proovidele, mis olid inkubeeritud proteasoomi inhibiitori ja tBHQ kombinatsiooniga. Seega tBHQ lisamine MG132-le ei muuda viimase proteasoomi inhibeerimise efekti (Joonis 11B, CySk, SNE MG132 töötlusega proov 3 vs tBHQ ja MG132 töötlusega proov 6). Lisaks on näha ka H_2O_2 -i poolt tekitatud redelit tsütoskelti (CySk) fraktsioonis, redel on nõrgem, kui proteasoomi inhibiitoriga üksi või kombinatsioonis tBHQ-ga (Joonis 11B, H_2O_2 töötlusega proovid 2, 4 vs MG132 ja tBHQ töötlusega proovid 3, 6). H_2O_2 ja proteasoomi inhibiitoriga kombineeritud proovi puhul on ubikvitineerimise tase sama suur, kui H_2O_2 -ga üksi (Joonis 11B, H_2O_2 töötlusega proov 2 vs H_2O_2 ja MG132 töötlusega proov 4).

2.4. Arutelu

Antud uurimustöös võrreldi helikaasi kompleksi MCM2–7 subühiku MCM3-e ja transkriptsioonifaktori NRF2-e käitumist vastusena oksüdatiivsele stressile. Võrdluse lähtepunktiks oli teadmine, et nii NRF2 kui ka MCM3 interakteeruvad KEAP1-ga, mis on tuntud oksüdatiivse stressi sensorvalk. Siiani pole aga täpselt teada, millist rolli KEAP1 ja MCM3- e omavaheline interaktsioon rakus omab. Seega oli uurimustöö peamiseks eesmärgiks näha, kas MCM3 ja NRF2 võiksid stressile vastata sarnase või kardinaalselt erineva mustriga. Sarnasus viitaks asjaolule, et MCM3 ja NRF2 reageerivad oksüdatiivsele stressile analoogse regulatsioonimehhanismi kaudu, milles võib oma rolli mängida ka sensorvalk KEAP1. Kardinaalselt erinev muster võiks viidata aga sellele, et stressi olukorras asendab KEAP1 oma peamise interaktsioonipartneri – NRF2 – MCM3-e vastu välja.

Käesolevas töös läbiviidud katsete põhjal tundub, et ainus selge sarnasus MCM3 ja NRF2-e käitumises vastusena oksüdatiivsele stressile on nende valkude taseme tõus ja ubikvitineerimise muster tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis H_2O_2 juuresolekul. Kui MCM3-e puhul tundub taseme tõus tulevat raku lahustuvate fraktsioonide arvelt (tsütoplasmast, tuuma lahustuvatest osadest ning membraanest ekstraktist), siis NRF2-e puhul seda väita ei saa. NRF2 valgu taseme tõus tsütoskeletil H_2O_2 -i toimetuleb ilmselt KEAP1-ga seotud NRF2 valkude taseme tõusu arvelt, sest viimased jäävad oksüdatiivse stressi ajal vaid ETGE vahendusel KEAP1-ga seotuks ning seetõttu ei pääse vabaks ja ei suuda tuuma liikuda (McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a). Nõrgem interaktsioon DLG motiiviga katkeb, KEAP1 IVR domeenis olevate, tsüsteiinjääkide modifikatsiooni tõttu (McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006 a; Tong et al., 2006 b). NRF2-e ubikvitineerimise tõusu tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis H_2O_2 -i toimetuleb aga seletada mõne muu, KEAP1-sõltumatu, raja aktiveerimisega, sest tekkinud kompleks on ilmselt vaja lagundada (McMahon et al., 2004). Antud uurimustöös näidati DNA kaheahelaliste katkete indikaatori γ -H2A.X taseme tõusu kromatiinil H_2O_2 -ga inkubeeritud rakkudes. Seega vihjab MCM3-e lokaliseerimise muutus asjaolule, et H_2O_2 -i poolt indutseeritud oksüdatiivse stressi korral võiks rakk üritada DNA replikatsiooni litsentseerimist inhibeerida. Selle tarbeks võidakse tuumas vabalt olevad MCM3 valgud tsütoskeletile transportida või blokeerida vastsünteesitud MCM3-de lokaliseerimist tuuma, sidudes neid tsütoskeletiga.

Proteasoomi inhibiitorid, mis blokeerivad ubikvitineeritud valkude degradatsiooni ning soodustavad nende kuhjumist, omasid MCM3 ja NRF2-e tasemetele erinevat mõju. NRF2-e puhul tõstis proteasoomi inhibiitorite lisamine valgu taset kõigis fraktsioonides. See on eelduspärane, sest tavaolekus on enamus rakus olevast NRF2 valgust ubikvitineeritud (Itoh et al., 1999) ning proteasoomi inhibeerimine takistab ubikvitineeritud vormi elimineerimist. NRF2 valgu kuhjumine koos proteasoomi inhibiitoritega väheneb H_2O_2 -i juuresolekul, millele KEAP1-e oksüdatiivse stressi suhtes tundlik IVR domeen reageerib (Dinkova-Kostova et al., 2002; Kobayashi et al., 2004; Ogura et al., 2010). Seega H_2O_2 -i lisamine võtab proteasoomi inhibiitorite efekti maha, sest vähem NRF2-te ubikvitineeritakse oksüdatiivse stressi tingimustes ja NRF2 ubikvitineeritud vorm ei saa kuhjuda. tBHQ lisamine seevastu ei langeta proteasoomi inhibiitorite mõju NRF2-e tasemele ja ubikvitineerimise mustriks, vaid jääb kas sellele alla või täiendab inhibiitori mõju. See võib viidata asjaolule, et H_2O_2 ning tBHQ aktiveerivad oksüdatiivse stressi korral erinevaid vastusradasid. Väidet toetab ka kirjandus, mis jagab H_2O_2 ja tBHQ-i erinevatesse KEAP1 aktivaatorite klassi tsüsteiinjääkide modifikatsiooni alusel (Saito et al., 2015). Ilmselt on MCM3 valk NRF2-st stabiilsem ja seda ei degradeerita nii kiiresti, seetõttu pole antud katseskeemides MCM3 valgu kuhjumist proteasoomi inhibiitorite lisamisel võimalik näha. NRF2-e eluiga on normaalolekus alla 10 minuti ning oksüdatiivse stressi olukorras 40 minuti ringis, seega on NRF2 puhul nii valgu tase kui ka eluiga redoks-sensitiivsed (McMahon et al., 2004). Stressi seisundis toimub NRF2 lagundamine KEAP1-sõltumatu degradatsiooni raja kaudu, mille eest vastutab NRF2-e Neh6 domeen (McMahon et al., 2004).

Ei tBHQ ega $KBrO_3$ ei näi omavat erilist mõju MCM3 tasemele, lokaliseerimisele või ubikvitineerimise mustriks. Seega võiks antud katseskeemide põhjal eeldada, et vaid H_2O_2 on MCM3 taseme spetsiifiline tõstja tsütoskeleti (CySk) fraktsioonis. NRF2-e puhul ilmnes aga, et tBHQ ning $KBrO_3$ mõjuvad rakkudele üsna sarnaselt, tõstes NRF2-e taset kõigis fraktsioonides, kõige enam aga lahustuva tuuma (SNE) ja tsütoplasma (CPE) fraktsioonis. Seega võib antud katsete põhjal järeldada, et tBHQ ja $KBrO_3$ -le reageerivad rakud ühe mehhanismi ning H_2O_2 -le teise mehhanismi kaudu. Tundub, et tBHQ ja $KBrO_3$ mõjutavad rakke klassikaliselt ja KEAP1 sõltuvalt. Selle kohaselt surutakse KEAP1 sõltuv NRF2 ubikvitineerimine ja edasine 26S proteasomaalne proteolüüsi maha, mis stabiliseerib NRF2 valku ja lubab sellel tuuma translokeeruda ning seal oksüdatiivse stressi vastusgeeni transkriptsiooni aktiveerida (Kobayashi et al., 2006; McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006a; Tong et al., 2006b). Seda illustreerib ka see, et proteasoomi inhibiitorid annavad tBHQ ja $KBrO_3$ -ga sarnase NRF2-e

mustri. DNA kahjustused ei tundu mängivat otsest rolli rakkude vastuse määramisel, kuna DNA kaheaahelised katked esinesid nii H_2O_2 kui ka $KBrO_3$ -i juuresolekul, kuid kummagi stressori poolt indutseeritud MCM3 ja NRF2 tasemete vastus oli erinev. Seda kinnitavad ka meie labori varasemaid tulemusi, kus DNA kahjustused üksi ei ole piisavad MCM3-e lokaliseerimise muutmiseks.

Kõige suuremaid sarnasusi KEAP1 ja NRF2-e lokaliseerimises ja tasemes võib näha H_2O_2 -i ja proteasoomi inhibiitorite toimel tsütoskeleti (CySk) fraktsioneerimises, kus mõlema valguga tase vastab tõusuga. Ka teistes fraktsioonides käituvad valgud H_2O_2 -i ja proteasoomi inhibiitoritega suhteliselt sarnaselt. KEAP1 ja MCM3-e vahelisi sarnasusi leidis samuti tsütoskeletil H_2O_2 -i juuresolekul, kus kummagi valguga tase tõusis. Pikemaajalise stressi katsetes on MCM3 ja KEAP1-e puhul näha ka valguga samaaegset kadu raku lahustuvatest fraktsioonidest. Lühema inkubatsiooniajaga on valguga kadumine vähem märgatav. tBHQ ei näi põhjustavat erilisi muutusi KEAP1 valguga tasemes. Huvitaval kombel tõstab $KBrO_3$ KEAP1-e tase tsütoplasma (CPE) fraktsioneerimises tugevalt üles ja veidi nõrgemalt ka membraani ekstraktis (ME). Tegemist on mõnevõrra ootamatu ja senistele teadmistele vasturääkiva tulemusega, mis vajaks kindlasti täiendavat uurimist. Siiani pole täheldatud, et KEAP1-te aktiveerivad stressorid mõjuksid KEAP1 tasemele.

Kui KEAP1 reguleerib MCM3-e taset, siis toimub see spetsiifiliselt H_2O_2 -st sõltuvalt ja tsütoskeletil. Sellisel juhul ei toimu see aga klassikalise KEAP1 sõltuva NRF2-e stabiliseerumise rajaga sarnaselt, kuna proteasoomi inhibiitoritega 26S proteasoomi inhibeering ei anna H_2O_2 -ga sarnast MCM3-e taseme tõusu ei tsütoskeletil ega üheski teises fraktsioonis. Kõige loogilisem MCM3 valguga KEAP1-sõltuva regulatsiooni seletus viitab sellele, et KEAP1 ei reguleeri mitte MCM3 proteolüüsi vaid ainult lokaliseerimist, ankurdades MCM3-e füüsiliselt tsütoskeleti külge. See seletab ka seda, miks MCM3 proteasoomi inhibiitoritega tsütoskeletile ei kogune. Lisaks, sõltumata sellest, kas tegemist on KEAP1 sõltuva või sõltumatu protsessiga, on tegemist vaid H_2O_2 -i spetsiifilise efektiga, kuna tBHQ ja $KBrO_3$ -i toimel MCM3 tsütoskeletile ei kogune, kuigi NRF2 taseme samaaegne tõus näitab, et KEAP1 on nendes tingimustes aktiveeritud. Sealjuures võivad need faktid ning lisaks ka kõigi kolme valguga (MCM3, NRF2 ja KEAP1) liikumine tsütoskeletile H_2O_2 -i toimel peegeldada sootuks teist, nende omavahelistest seostest sõltumatut, regulatsiooniprotsessi.

Katsete tulemustest selgub, et MCM3 ja NRF2-e käitumine vastusena oksüdatiivsele stressile on üldjoontes erinev. Kattuvad mustrid esinesid vaid tsütoskeletil ning spetsiifiliselt H_2O_2 juuresolekul. Samuti viitavad katsetulemused asjaolule, et tBHQ ja $KBrO_3$ mõjuvad rakkudele klassikalise ning H_2O_2 mitteklassikalise KEAP1-sõltuva mehhanismiga. MCM3 valgu KEAP1-sõltuv regulatsioonimehhanism tundub olevat H_2O_2 -i spetsiifiline ning seotud mitte MCM3-e proteolüüsi regulatsiooni vaid füüsilise ankurdamisega tsütoskeleti külge. Kuna tBHQ näol on tegemist klassikalise KEAP1 aktivaatoriga, mis järgib tüüpilist KEAP1 sõltuvat loogikat ning H_2O_2 mitte, siis võib antud uurimustöö katsete põhjal järeldada, et H_2O_2 ei pruugi olla parim aktivaator KEAP1 efektide uurimiseks MCM3-le.

Tulevikus oleks asjakohane täpselt välja selgitada, kas MCM3 valgu tsütoskeletile minek on KEAP1 sõltuv protsess või mitte. Kaugema ja üldisema eesmärgina tuleks kindlaks teha KEAP1-MCM3 interaktsiooni võimalik roll genoomi replikatsiooni regulatsioonis.

KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kas replikatiivse helikaasi kompleksi MCM2–7 subühiku MCM3 ning transkriptsioonifaktori NRF2 käitumine vastusena oksüdatiivsele stressile toimub sarnase või erineva regulatsioonimehhanismi alusel. Võrdluse kaudu üritati tuvastada võimalikku KEAP1-sõltuvat MCM3 regulatsiooni oksüdatiivse stressi olukorras. Oksüdatiivse stressi indutseerimiseks kasutati kolme erinevat stressorit – H_2O_2 , tBHQ, KBrO_3 – et teada saada, kas katsetes nähtavad stressivastused on stressori spetsiifilised või universaalsed.

Käesoleva töö tulemustest selgus, et NRF2 ja MCM3 vastavad stressile üldiselt erineva mustriga, ainus sarnasus esines tsütoskeletil H_2O_2 juuresolekul, mis kummagi valgu taset ning ubiquitineerimist tõstis. Töös kasutatavate oksüdatiivse stressi indutseerijate võrdlus viitas sellele, et MCM3 reageerib spetsiifiliselt vaid H_2O_2 -le. Ilmnes, et H_2O_2 -i poolt esile kutsutud stressivastus põhjustab MCM3 valgu liikumist raku lahustuvatest osadest tsütoskeleti külge. MCM3 liikumine tsütoskeletile võib toimuda KEAP1 sõltuvalt, sest nii KEAP1 kui MCM3 tase tõuseb tsütoskeletil H_2O_2 juuresolekul. Lisaks on teada, et KEAP1 on aktiini külge ankurdunud valk.

H_2O_2 , tBHQ ja KBrO_3 -i kasutamine KEAP1-NRF2 raja aktiveerimiseks andis võimaluse uurida, kas nende poolt indutseeritud stressivastus on sarnane või erinev. Katsete tulemused viitavad asjaolule, et tBHQ ja KBrO_3 mõjuvad rakkudele klassikalise ning H_2O_2 mitteklassikalise KEAP1-sõltuva mehhanismiga. Seega ei pruugi H_2O_2 olla parim aktivaator KEAP1 efektide uurimiseks MCM3-le.

SUMMARY

Comparison of the behavior of replicative helicase subunit MCM3 and transcription factor NRF2 under oxidative stress conditions

Mai-Brit Tănava

DNA replication is a central process in all living organisms, it is the basis for genome duplication and biological inheritance. Due to its immense importance the proper execution relies on complex regulatory pathways.

Cells often come to contact with a wide range of endogenous and exogenous stressors, that can damage genomic DNA and different other molecular components of the cell. KEAP1-NRF2 pathway is a well-known protection against oxidative, electrophilic and xenobiotic stress in the cell, relying on a. KEAP1 sensor protein that regulates the transcription factor NRF2 via ubiquitination and subsequent proteasomal degradation in unstressed conditions. Under oxidative and/or electrophilic stress KEAP1 releases NRF2 leading to its stabilization, nuclear translocation and ultimately to enhanced expression of genes coding for cytoprotective proteins.

It is known that NRF2 and one subunit of the replicative helicase complex - MCM3 - share the same motif needed for the interaction with KEAP1. So far it has not been confirmed that KEAP1 regulates MCM3 in oxidative stress. The results of this study showed that NRF2 and MCM3 generally respond differently to oxidative or xenobiotic stress with apparent similarities occurring only in cytoskeleton fraction in response to H₂O₂. It seems that MCM3 specifically reacts to H₂O₂ because tBHQ or KBrO₃ did not affect MCM3 location, protein level or ubiquitination. In the presence of H₂O₂ MCM3 seems to relocate from the soluble cytoplasmic and nuclear as well as membrane fractions to the cytoskeleton fraction. It can be proposed that KEAP1 might be the one to facilitate this MCM3 translocation because it is an actin-bound protein, it interacts with MCM3 and based on the presented results, it had a relocalization pattern similar to MCM3 in the presence of H₂O₂. Comparison of affects of different stress inducers suggested that tBHQ and KBrO₃ initiate a classical KEAP1 dependent mechanism, where NRF2 is stabilized and activated to upregulate its downstream genes. On the other hand, H₂O₂ seems to induce a different KEAP1 dependent mechanism and thus it might not be the best oxidative stress inducer for investigating KEAP1 effects on MCM3.

KIRJANDUSE LOETELU

- Arias, E.E. & Walter, J.C. (2005). Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 19:114–26.
- Baird, L. & Dinkova-Kostova, A.T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85:241–272.
- Ballmaier, D. & Epe, B. (2006). DNA damage by bromate: mechanism and consequences. *Toxicology.* 221:166–71.
- Ballmaier, D. & Epe, B. (1995). Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 16:335–342.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. & Seemüller, E. (1998). The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell.* 92:367–380.
- Bell, S.P. & Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71:333–74.
- Bell, S.P. & Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature.* 357:128–34.
- Ben-Nissan, G. & Sharon, M. (2014). Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules.* 4:862–84.
- Blow, J.J. & Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:476–86.
- Blow, J.J. & Gillespie, P.J. (2008). Replication licensing and cancer--a fatal entanglement? *Nat. Rev. Cancer.* 8:799–806.
- Bochman, M.L. & Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Mol. Cell.* 31:287–93.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. & Huber, R. (1999). The Proteasome. 28:295–317.
- De Bont, R. & van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 19:169–85.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106:761–771.
- Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128:617–30.
- Cadet, J. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features.

- Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 531:5–23.
- Chan, K. & Kan, Y.W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:12731–6.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527–605.
- Chen, S., de Vries, M.A. & Bell, S.P. (2007). Orc6 is required for dynamic recruitment of Cdt1 during repeated Mcm2-7 loading. *Genes Dev.* 21:2897–907.
- Cheng, I.H., Roberts, L.A. & Tye, B.K. (2002). Mcm3 is polyubiquitinated during mitosis before establishment of the pre-replication complex. *J. Biol. Chem.* 277:41706–41714.
- Chuang, C.H., Yang, D., Bai, G., Freeland, A., Pruitt, S.C. & Schimenti, J.C. (2012). Post-transcriptional homeostasis and regulation of MCM2-7 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 40:4914–4924.
- Ciccina, A. & Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* 40:179–204.
- Cocker, J.H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. & Diffley, J.F. (1996). An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature.* 379:180–2.
- Costa, A., Hood, I. V. & Berger, J.M. (2013). Mechanisms for Initiating Cellular DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.* 82:25–54.
- Costa, A., Ilves, I., Tamberg, N., Petojevic, T., Nogales, E., Botchan, M.R. & Berger, J.M. (2011). The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:471–7.
- Coster, G., Frigola, J., Beuron, F., Morris, E.P. & Diffley, J.F.X. (2014). Origin licensing requires ATP binding and hydrolysis by the MCM replicative helicase. *Mol. Cell.* 55:666–77.
- Crevel, G. (2001). Nearest neighbour analysis of MCM protein complexes in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 29:4834–4842.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W. & Diehl, J.A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* 24:8477–86.
- Davey, M.J., Indiani, C. & O'Donnell, M. (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture. *J. Biol. Chem.* 278:4491–9.
- DeMartino, G., Moomaw, C., Zagnitko, O., Proske, R., Chu-Ping, M., Afendis, S., Swaffield, J. & Slaughter, C. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 269:20878–20884.

- Diffley, J.F.X. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr. Biol.* 14:R778–86.
- Diffley, J.F., Cocker, J.H., Dowell, S.J. & Rowley, A. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell.* 78:303–16.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. & Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:11908–13.
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., Stillman, B. & Speck, C. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:20240–5.
- Forman, H.J., Fukuto, J.M. & Torres, M. (2004). Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C246–56.
- Forman, H.J., Torres, M. & Fukuto, J. (2002). Redox signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235:49–62.
- Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:109–131.
- Gambus, A., Khoudoli, G.A., Jones, R.C. & Blow, J.J. (2011). MCM2-7 form double hexamers at licensed origins in *Xenopus* egg extract. *J. Biol. Chem.* 286:11855–64.
- Gille, H. & Messer, W. (1991). Localized DNA melting and structural perturbations in the origin of replication, *oriC*, of *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *EMBO J.* 10:1579–84.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V. a & Finley, D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 18:3149–3162.
- Green, B.M. & Li, J.J. (2005). Loss of rereplication control in *Saccharomyces cerevisiae* results in extensive DNA damage. *Mol. Biol. Cell.* 16:421–32.
- Green, M. R., Sambrook, J. (2012). SDS-PAGE of Proteins, p. 1692. In *molecular cloning: a laboratory manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbo, New York.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. & Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386:463–71.
- Hast, B.E., Goldfarb, D., Mulvaney, K.M., Hast, M.A., Siesser, P.F., Yan, F., Hayes, D.N. & Major, M.B. (2013). Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 73:2199–210.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S. & Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1456–1462.

- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425–479.
- Hershko, A. & Heller, H. (1985). Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:1079–1086.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258:8206–14.
- Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (2012). Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 40:10228–39.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30:405–39.
- Iida, K., Itoh, K., Kumagai, Y., Oyasu, R., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H. & Yamamoto, M. (2004). Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 64:6424–31.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J. & Botchan, M.R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol. Cell.* 37:247–258.
- Imhoff, B.R. & Hansen, J.M. (2010). Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. *Cell Biol. Toxicol.* 26:541–51.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I. & Utsumi, K. (2003). Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Curr. Med. Chem.* 10:2495–2505.
- Ishii, T. (2000). Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 275:16023–16029.
- Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J. Biol. Chem.* 272:24508–13.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:313–322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13:76–86.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E. V & Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* 146:11–31.
- Jain, A.K., Bloom, D.A. & Jaiswal, A.K. (2005). Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J. Biol. Chem.* 280:29158–68.

- Kang, Y.-H., Galal, W.C., Farina, A., Tappin, I. & Hurwitz, J. (2012). Properties of the human Cdc45/Mcm2-7/GINS helicase complex and its action with DNA polymerase epsilon in rolling circle DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:6042–7.
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G. & Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2046–2051.
- Kang, S., Warner, M.D. & Bell, S.P. (2014). Multiple functions for Mcm2-7 ATPase motifs during replication initiation. *Mol. Cell.* 55:655–65.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H. & Levonen, A.-L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1:45–9.
- Kimura, H., Ohtomo, T., Yamaguchi, M., Ishii, A. & Sugimoto, K. (1996). Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus. *Genes Cells.* 1:977–93.
- Kitamura, Y., Umemura, T., Kanki, K., Kodama, Y., Kitamoto, S., Saito, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Masegi, T., Nishikawa, A. & Hirose, M. (2007). Increased susceptibility to hepatocarcinogenicity of Nrf2-deficient mice exposed to 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Cancer Sci.* 98:19–24.
- Kobayashi, A., Kang, M., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. & Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24:7130–7139.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K. & Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26:221–9.
- Kuipers, M.A., Stasevich, T.J., Sasaki, T., Wilson, K.A., Hazelwood, K.L., McNally, J.G., Davidson, M.W. & Gilbert, D.M. (2011). Highly stable loading of Mcm proteins onto chromatin in living cells requires replication to unload. *J. Cell Biol.* 192:29–41.
- Lam, Y.A., Xu, W., DeMartino, G.N. & Cohen, R.E. (1997). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature.* 385:737–740.
- Lau, A., Tian, W., Whitman, S.A. & Zhang, D.D. (2013). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxid. Redox Signal.* 18:91–3.
- Levonen, A.-L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D.A., Zanoni, G., Morrow, J.D. & Darley-Usmar, V.M. (2004). Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* 378:373–82.
- Liang, C., Weinreich, M. & Stillman, B. (1995). ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell.* 81:667–76.
- Liku, M.E., Nguyen, V.Q., Rosales, A.W., Irie, K. & Li, J.J. (2005). CDK phosphorylation of a

- novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication. *Mol. Biol. Cell.* 16:5026–39.
- Limón-Pacheco, J. & Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res.* 674:137–47.
- Liu, J., Smith, C.L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G.S. & Berger, J.M. (2000). Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol. Cell.* 6:637–48.
- Liu, Q., Zhou, H., Langdon, W.Y. & Zhang, J. (2014). E3 ubiquitin ligase Cbl-b in innate and adaptive immunity. *Cell Cycle.* 13:1875–84.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. & Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* (80-.). 268:533–539.
- Lyubimov, A.Y., Costa, A., Bleichert, F., Botchan, M.R. & Berger, J.M. (2012). ATP-dependent conformational dynamics underlie the functional asymmetry of the replicative helicase from a minimalist eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:11999–2004.
- Ma, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* 125:376–93.
- Matson, S.W., Bean, D.W. & George, J.W. (1994). DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays.* 16:13–22.
- McMahon, M., Lamont, D.J., Beattie, K.A. & Hayes, J.D. (2010). Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:18838–43.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J. Biol. Chem.* 281:24756–68.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.* 279:31556–67.
- Méndez, J. & Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 20:8602–12.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:9926–30.

- Moyer, S.E., Lewis, P.W. & Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:10236–41.
- Nguyen, V.Q., Co, C., Irie, K. & Li, J.J. (2000a). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2–7. *Curr. Biol.* 10:195–205.
- Nguyen, V.Q., Co, C. & Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature.* 411:1068–73.
- Nguyen, T., Huang, H.C. & Pickett, C.B. (2000b). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J. Biol. Chem.* 275:15466–15473.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. & Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature.* 404:625–8.
- Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C. & Yamamoto, M. (2010). Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:2842–7.
- Padmanabhan, B., Nakamura, Y. & Yokoyama, S. (2008). Structural analysis of the complex of Keap1 with a prothymosin alpha peptide. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64:233–8.
- Petojevic, T., Pesavento, J.J., Costa, A., Liang, J., Wang, Z., Berger, J.M. & Botchan, M.R. (2015). Cdc45 (cell division cycle protein 45) guards the gate of the Eukaryote Replisome helicase stabilizing leading strand engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:E249–58.
- Piatti, S., Böhm, T., Cocker, J.H., Diffley, J.F. & Nasmyth, K. (1996). Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a “point of no return” after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev.* 10:1516–31.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P. & Diffley, J.F.X. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell.* 139:719–30.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* 273:5858–5868.
- Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., Iso, T., Yamamoto, H., Morita, M., Baird, L., Furusawa, Y., Negishi, T., Ichinose, M. & Yamamoto, M. (2015). Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 36:271–84.
- Samel, S.A., Fernández-Cid, A., Sun, J., Riera, A., Tognetti, S., Herrera, M.C., Li, H. & Speck, C. (2014). A unique DNA entry gate serves for regulated loading of the eukaryotic replicative helicase MCM2-7 onto DNA. *Genes Dev.* 28:1653–66.

- Schulte, D., Burkhardt, R., Musahl, C., Hu, B., Schlatterer, C., Hameister, H. & Knippers, R. (1995). Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human P1 protein, a homologue of the yeast Mcm 3 replication protein. *J. Cell Sci.* 108:1381–1389.
- Siddiqui, K., On, K.F. & Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a012930.
- Siraki, A.G., Pourahmad, J., Chan, T.S., Khan, S. & O'Brien, P.J. (2002). Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 32:2–10.
- Speck, C., Chen, Z., Li, H. & Stillman, B. (2005). ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:965–71.
- Symeonidou, I.-E., Kotsantis, P., Roukos, V., Rapsomaniki, M.-A., Grecco, H.E., Bastiaens, P., Taraviras, S. & Lygerou, Z. (2013). Multi-step loading of human minichromosome maintenance proteins in live human cells. *J. Biol. Chem.* 288:35852–67.
- Zhang, D.D. & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 23:8137–51.
- Zhang, D.D., Lo, S.-C., Cross, J. V, Templeton, D.J. & Hannink, M. (2004a). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 24:10941–10953.
- Tanaka, S. & Araki, H. (2013). Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a010371.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T. & Yamamoto, M. (2006a). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.* 26:2887–2900.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M. (2006b). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* 387:1311–20.
- Tong, K.I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S. & Yamamoto, M. (2007). Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol. Cell. Biol.* 27:7511–21.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2040–5.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44–84.

- Venugopal, R. & Jaiswal, A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:14960–5.
- Wiese, A.G., Pacifici, R.E. & Davies, K.J. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:231–40.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. & Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science.* 290:2309–12.
- Yabuuchi, H., Yamada, Y., Uchida, T., Sunathvanichkul, T., Nakagawa, T. & Masukata, H. (2006). Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *EMBO J.* 25:4663–74.
- Yeeles, J.T.P., Deegan, T.D., Janska, A., Early, A. & Diffley, J.F.X. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature.* 519:431–5.
- Young, M.R., Suzuki, K., Yan, H., Gibson, S. & Tye, B.K. (1997). Nuclear accumulation of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm3 is dependent on its nuclear localization sequence. *Genes Cells.* 2:631–43.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Ivar Ilvest ja Siret Somarokovi oskusliku juhendamise eest. Teie väärt nõuanded olid antud lõputöö valmimise jaoks määramatu tähtsusega. Suured tänud ka teistele meie uurimisgrupi liikmetele sõbraliku ja toetava õhkkonna loomisel.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mai-Brit Tänava (sünnikuupäev: 17.04.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Replikatiivse helikaasi subühiku MCM3 ja transkriptsioonifaktori NRF2 käitumise võrdlus oksüdatiivse stressi tingimustes”, mille juhendajad on Ivar Ilves ja Siret Somarokov

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016